

GILCÉLIA APARECIDA CORDEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ESPETROSCÓPICAS
MULTIVARIADAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS EM
FORMAS FARMACÊUTICAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica, Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Patricio G. Peralta-Zamora

**Curitiba
2006**

Dedico este trabalho
aos meus pais Oilson e Sirlei, pelo amor e
pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente acredito que tenho que agradecer a Deus, pois nos momentos mais difíceis foi nele que encontrei forças para continuar.

Em especial gostaria de agradecer aos meus pais Oilson e Sirlei, pelo amor, pelo apoio e dedicação incondicional, serei eternamente grata e “sem vocês eu jamais teria conseguido”.

Ao meu orientador e amigo Prof. Patricio Peralta-Zamora, por ter dedicado horas do seu dia para me orientar e muitas vezes me incentivar, permitindo que “nós” tenhamos conseguido terminar este trabalho, além de sempre estar disposto a me ouvir, saiba que você teve um papel fundamental na minha formação, tanto como profissional, quanto pessoal.

A minha família, meu irmão Marcelo e minha cunhada Giselle, a minha irmã Gilmara e meu cunhado Anízio e a minha irmãzinha Gilciane e meu cunhado Roberto, pelo apoio e compreensão das minhas ausências nos almoços de domingo.

Aos meus amados sobrinhos Murilo e Felipe, que sem saber, tiveram um papel muito importante nesta etapa da minha vida, já que sempre trouxeram muita alegria e paz para mim.

Ao Grupo TECNOTRATER, Josmaria, Sérgio, Toshio, Livia, Kely, Elaine, Adriane, Priscila, Márcia, Vanessa, Dani, Bárbara, Luciana, Elenise e especialmente à Carla, Elias e Claudinho, já que estivemos sempre “batalhando” juntos. Só tenho a agradecer a esta que é a minha segunda família, que me acolheu com muito carinho e que fizeram meus dias de trabalho muito mais felizes.

A professora Dra. Iara Messerschmidt, por ter contribuído muito durante todo o desenvolvimento deste trabalho, além de ter aceitado fazer parte da banca do meu exame de qualificação, sempre com observações pertinentes.

Ao professor Dr. Lauro Camargo Dias Junior, por ter aceitado participar do exame de qualificação e por feito colocações muito úteis para finalização deste trabalho.

Ao professor Dr. Roberto Pontarolo, que me ajudou desde o início do trabalho, inclusive orientando o meu objeto de estudo, e por ter estado à disposição para esclarecer todas as minhas dúvidas.

Aos colegas do LabQAM, ao Prof. Dr. Marco T. Grassi e ao GQA, ao Fernando, Elizabeth, Danielle, Vanessa, Nelissa e Fabiana. Ao Prof. Dr. Aldo J. G. Zarbin e ao GQM, à Marcela, Mariane, Eryza, Cláudio, Giselle, Willian, Aline, Humberto e Edson, pela feliz convivência durante estes anos.

A minha amiga e companheira de fim de semana, Alessandra Tonietto, que compartilhou momentos importantes não só deste trabalho, mas também da minha vida.

Aos meus “estagiários”: Renan, Marília e Luciana, que colaboraram muito na execução deste projeto e que transformaram os dias de trabalho muito mais produtivos e alegres.

Às minhas amigas e companheiras “superpoderosas” Luciane e Maisa, por nunca me deixarem e por compreender a minha ausência em determinadas ocasiões.

À minha amiga, irmã e afilhada Regina Ishy, que soube compreender o meu trabalho e sempre me incentivou para que chegasse até aqui.

Às minhas irmãzinhas de coração Daniela Gallas e Daniela Martini, que foram presenças importantes durante todo o período deste trabalho, sempre ao meu lado em todas as ocasiões.

A Paula Rossignoli, por toda a ajuda prestada, desde esclarecimentos sobre fármacos até o fornecimento de matéria-prima, mas principalmente por ter se tornado uma amiga maravilhosa e companheira inseparável.

Ao professor Cláudio Tonegutti e à todos os membros do Grupo PET-Química da UFPR.

À professora Dra. Izaura H. Kuwabara, por todos os ensinamentos, tanto científicos quanto sociais, que foram importantes na minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Harley Paiva Martins Filho, pelo auxílio na aquisição dos gráficos de superfície de resposta.

A minha amiga Aline Dossa, que compartilhou muitos momentos e sempre esteve disposta a me ajudar em qualquer situação.

À Maria da Graça, do Departamento de Farmácia, pelo auxílio nas análises cromatográficas.

Ao laboratório Farmanguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz, em especial ao Norberto Campos, pelo fornecimento dos padrões analíticos, utilizados neste trabalho.

Aos todos os Professores e ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR.

À CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro do projeto.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho...

SUMÁRIO

TERMO DE APROVAÇÃO	ii
DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xix
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	3
2.1. FÁRMACOS E MEDICAMENTOS	3
2.1.1. Associação Sulfametoxazol-Trimetroprima	4
2.2. ANÁLISE DE FÁRMACOS	7
2.3. ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS	8
2.3.1. Espectroscopia Molecular na Região Ultravioleta e Visível	8
2.3.2. Espectroscopia Infravermelho por Refletância Difusa	10
2.4. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	13
2.4.1. Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR)	14
2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	16
2.5.1 Especificidade e Seletividade	17
2.5.2 Intervalo	18
2.5.3 Linearidade	19
2.5.4 Exatidão	19
2.5.5 Precisão	20
2.5.6 Robustez	21
3. OBJETIVO GERAL	23
4. PARTE EXPERIMENTAL	24
4.1. MATERIAIS E REAGENTES	24
4.2. EQUIPAMENTOS	24
4.3. PROGRAMAS COMPUTACIONAIS	25
4.4. METODOLOGIA	25

4.4.1. Desenvolvimento de modelos de calibração por espectroscopia UV-Vis em solução	25
4.4.1.1. Modelos univariados convencionais	25
4.4.1.2. Modelos multivariados	25
4.4.1.2.1. Validação do Modelo multivariado	28
4.4.2. Desenvolvimento de modelos de calibração por espectroscopia infravermelho com refletância difusa	29
4.4.3. Análise de amostras reais	31
4.4.4. Análise por CLAE	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. ESPECTROSCOPIA UV-VIS EM SOLUÇÃO	32
5.1.1. Análise Convencional Univariada	32
5.1.2. Espectrofotometria Derivativa	35
5.1.3. Método da aditividade espectrofotométrica	38
5.1.4. Comentários Sobre as Alternativas Espectroscópicas Convencionais	39
5.1.5. Análise Espectrofotométrica Multivariada	41
5.1.5.1. Espectrofotometria com Espectros Originais	41
5.1.5.2. Espectrofotometria Derivativa	48
5.1.5.3. Espectrofotometria com Autoescalamento	53
5.1.6. Análise de amostras reais (medicamentos)	55
5.1.7. Estudos de validação	61
5.1.7.1. Precisão	61
5.1.7.1.1. Repetibilidade	61
5.1.7.1.2. Reprodutibilidade	61
5.1.7.2. Robustez	64
5.1.7.2.1. Influência da temperatura	64
5.1.7.2.2. Influência do tempo de leitura	66
5.1.7.2.3. Influência do pH	67
5.2. ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA	69
5.2.1. Construção de Modelos Multivariados com Espectros Originais	70
5.2.2. Construção de Modelos Multivariados com Espectros Pré-tratados	75
5.2.3. Análise de Amostras Reais (Medicamentos)	82

6. CONCLUSÕES	88
6.1. ESPECTROSCOPIA UV-VIS	88
6.2. ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO POR REFLETÂNCIA DIFUSA	89
7. TRABALHOS FUTUROS	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	REGIÕES ESPECTRAIS DO INFRAVERMELHO	10
TABELA 2.	ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE ACORDO COM A SUA FINALIDADE.	17
TABELA 3.	FATORES QUE DEVEM SER CONSIDERADOS NA DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO.	22
TABELA 4.	RESULTADOS OBTIDOS PELO MÉTODO DE INTERPOLAÇÃO NA CURVA DE CALIBRAÇÃO DOS ESPECTROS ORIGINAIS	35
TABELA 5.	RESULTADOS OBTIDOS PELO MÉTODO DE INTERPOLAÇÃO NA CURVA DE CALIBRAÇÃO EM PRIMEIRA DERIVADA	38
TABELA 6.	RESULTADOS OBTIDOS PELO MÉTODO DA ADITIVIDADE DE ABSORVÂNCIAS.	39
TABELA 7.	RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES PREVISTAS NAS ANÁLISES DE MISTURAS SINTÉTICAS CONTENDO SMZ E TMP, POR PROCESSOS DE CALIBRAÇÃO CONVENCIONAL.	40
TABELA 8.	COMPOSIÇÃO DAS MISTURAS UTILIZADAS NAS ETAPAS DE CALIBRAÇÃO (NORMAL) E VALIDAÇÃO (NEGRITO) NO DESENVOLVIMENTO DE MODELOS MULTIVARIADOS UTILIZANDO-SE ESPECTROSCOPIA UV-VIS EM SOLUÇÃO.	41
TABELA 9.	RESULTADOS DA PREVISÃO DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg L ⁻¹ E ERRO EM %).	47

TABELA 10.	RESULTADOS DA PREVISÃO DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO, COM ESPECTROS EM PRIMEIRA DERIVADA E ALISADOS (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg L^{-1} E ERRO EM %).	52
TABELA 11.	RESULTADOS DA PREVISÃO DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO, COM ESPECTROS AUTOESCALADOS (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg L^{-1} E ERRO EM %).	54
TABELA 12.	RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS UTILIZANDO-SE O MELHOR MODELO MULTIVARIADO.	56
TABELA 13.	FLUTUAÇÃO DA MASSA DOS COMPRIMIDOS DOS MEDICAMENTOS ANALISADOS E A SUA INFLUÊNCIA NA CONCENTRAÇÃO DOS PRINCÍPIOS EM SOLUÇÃO.	57
TABELA 14.	RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIM NO ENSAIO DE REPETIBILIDADE.	62
TABELA 15.	RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIM NO ENSAIO DE REPRODUTIBILIDADE.	63
TABELA 16.	RESULTADOS OBTIDOS NA PREVISÃO DA MISTURA SMZ + TMP, EM DIFERENTES TEMPERATURAS.	65
TABELA 17.	RESULTADOS OBTIDOS NA PREVISÃO DAS SOLUÇÕES DE SMZ E TMP EM DIFERENTES TEMPOS DE LEITURA.	67
TABELA 18.	RESULTADOS OBTIDOS NA PREVISÃO DA MISTURA SMZ + TMP, EM DIFERENTES VALORES DE pH.	68

TABELA 19.	RESULTADOS DA PREVISÃO DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg g^{-1} E ERRO EM %), UTILIZANDO-SE MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS DRIFT NA REGIÃO DE 7001 A 399 cm^{-1} .	72
TABELA 20.	RESULTADOS DA PREVISÃO DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg g^{-1} E ERRO EM %), UTILIZANDO-SE MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS DRFIT NA REGIÃO DE 4000 A 399 cm^{-1} .	73
TABELA 21.	RESULTADOS DA PREVISÃO DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg g^{-1} E ERRO EM %), UTILIZANDO-SE MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS DRFIT NA REGIÃO DE 7001 a 4000 cm^{-1} .	74
TABELA 22.	ERROS PERCENTUAIS OBTIDOS NA PREVISÃO DE SMZ E TMP, UTILIZANDO-SE OS MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS EM PRIMEIRA DERIVADA E ALISADOS.	78
TABELA 23.	ERROS PERCENTUAIS OBTIDOS NA PREVISÃO DE SMZ E TMP, UTILIZANDO-SE OS MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS AUTOESCALONADOS.	79
TABELA 24.	ERROS PERCENTUAIS OBTIDOS NA PREVISÃO DE SMZ E TMP, UTILIZANDO-SE OS MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS SUBMETIDOS A CORREÇÃO MULTIPLICATIVA DE SINAIS.	80

TABELA 25.	RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DE	
	MEDICAMENTOS UTILIZANDO-SE O MELHOR	82
	MODELO MULTIVARIADO	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	ESTRUTURA QUÍMICA DO SULFAMETOXAZOL	5
FIGURA 2.	ESTRUTURA QUÍMICA DO TRIMETOPRIM	5
FIGURA 3.	ETAPAS METABÓLICAS AFETADAS PELA AÇÃO DO SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIM	6
FIGURA 4.	ILUSTRAÇÃO DA INTERFERÊNCIA ESPECTRAL EM MISTURAS CONTENDO SMZ (20 mg.L ⁻¹) E TMP (16 mg.L ⁻¹).	9
FIGURA 5.	REPRESENTAÇÃO DAS REFLEXÕES ESPECULAR E DIFUSA	11
FIGURA 6.	ORGANIZAÇÃO DOS DADOS PARA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	14
FIGURA 7.	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA DESENVOLVIMENTO DE MODELOS MULTIVARIADOS POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.	26
FIGURA 8.	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA DESENVOLVIMENTO DE MODELOS MULTIVARIADOS POR ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA.	29
FIGURA 9.	ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS DO SULFAMETOXAZOL (A) E CURVAS DE CALIBRAÇÃO (B).	33
FIGURA 10.	ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS DO TRIMETOPRIM (A) E CURVAS DE CALIBRAÇÃO (B).	34
FIGURA 11.	PRIMEIRA DERIVADA DOS ESPECTROS DE SMZ (A) E CURVA DE CALIBRAÇÃO EM 203,5 nm (B).	36
FIGURA 12.	PRIMEIRA DERIVADA DOS ESPECTROS DE TMP (A) E CURVAS DE CALIBRAÇÃO EM 236,5 E 266,0 nm (B).	37
FIGURA 13.	ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS DAS MISTURAS DE SMZ E TMP UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO MUTIVARIADO	42

FIGURA 14.	GRÁFICO DO SOMATÓRIO DOS ERROS DE PREVISÃO (PRESS) <i>VERSUS</i> NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES.	43
FIGURA 15.	GRÁFICO DO COEFICIENTE DE REGRESSÃO <i>VERSUS</i> VARIÁVEIS ORIGINAIS PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 8 VLS.	45
FIGURA 16.	GRÁFICO DE RESÍDUOS ESTUDENTIZADOS <i>VERSUS</i> "LEVERAGE" PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 8 VLS	45
FIGURA 17.	GRÁFICO DE VALORES REAIS <i>VERSUS</i> VALORES PREVISTOS PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 8 VLS.	46
FIGURA 18.	ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS DAS MISTURAS DE SMZ E TMP, EM PRIMEIRA DERIVADA, UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO MUTIVARIADO.	49
FIGURA 19.	GRÁFICO DO SOMATÓRIO DOS ERROS DE PREVISÃO (PRESS) <i>VERSUS</i> NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES.	50
FIGURA 20.	GRÁFICO DO COEFICIENTE DE REGRESSÃO <i>VERSUS</i> VARIÁVEIS ORIGINAIS, PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 3 VLS.	50
FIGURA 21.	GRÁFICO DE RESÍDUOS ESTUDENTIZADOS <i>VERSUS</i> "LEVERAGE" PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 3 VLS.	51
FIGURA 22.	GRÁFICO DE VALORES REAIS <i>VERSUS</i> VALORES PREVISTOS, PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 3 VLS.	51
FIGURA 23.	REPRESENTAÇÃO DO ERRO MÉDIO DA PREVISÃO DE SMZ E TMP, EM FUNÇÃO DO PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES.	55

FIGURA 24.	FLUTUAÇÃO DA MASSA DOS COMPRIMIDOS DO MEDICAMENTO DE REFERÊNCIA (BACTRIM) E A SUA INFLUÊNCIA NA CONCENTRAÇÃO DOS PRINCÍPIOS EM SOLUÇÃO.	57
FIGURA 25.	ESPECTROS UV-VIS DE UMA MISTURA SINTÉTICA UTILIZADA NA CALIBRAÇÃO E OS MEDICAMENTOS ANALISADOS.	59
FIGURA 26.	ESPECTROS UV-VIS DE SOLUÇÕES DE SULFAMETOXAZOL (A), UTILIZADAS NO ESTUDO DO EFEITO DA VARIAÇÃO DO pH. ESTRUTURA QUÍMICA DO SMZ, COM DESTAQUE PARA O ÁTOMO SUSCEPTÍVEL A PROTONAÇÃO (B).	59
FIGURA 27.	ESPECTROS UV-VIS DE SOLUÇÕES DE TRIMETOPRIM (A), UTILIZADAS NO ESTUDO DO EFEITO DA VARIAÇÃO DO pH. ESTRUTURA QUÍMICA DO TMP, COM DESTAQUE PARA OS ÁTOMOS SUSCEPTÍVEIS A PROTONAÇÃO (B).	60
FIGURA 28.	ESPECTROS UV-VIS DOS MEDICAMENTOS ANALISADOS E OS RESPECTIVOS VALORES DE pH (A). AMPLIAÇÃO DA REGIÃO COM MAIOR DESLOCAMENTO DA BANDA DE ABSORÇÃO (B).	60
FIGURA 29.	EFEITO DA TEMPERATURA NOS ESPECTROS UV-VIS DAS MISTURAS DE SULFAMETOXAZOL (20,00 mg L ⁻¹) E TRIMETOPRIM (4,00 mg L ⁻¹).	65
FIGURA 30.	ESPECTROS OBTIDOS PARA AS SOLUÇÕES DE SMZ + TMP EM DIFERENTES TEMPOS DE LEITURA.	66
FIGURA 31.	ESPECTROS DA MISTURA DE SMZ+ TMP, EM DIFERENTES VALORES DE pH.	68
FIGURA 32.	ESPECTROS DRIFT DAS ESPÉCIES EM ESTUDO, COM ATRIBUIÇÃO DAS BANDAS DE ESTIRAMENTO.	69

FIGURA 33.	ESPECTROS INFRAVERMELHOS (DRIFT) DAS MISTURAS DE SMZ E TMP UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO MUTIVARIADO.	70
FIGURA 34.	GRÁFICO DE PRESS (A) E VARIÂNCIA CAPTURADA PELAS VARIÁVEIS LATENTES (B) NO MODELO DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDO COM ESPECTROS COMPLETOS (7001-399 cm^{-1}).	71
FIGURA 35.	REPRESENTAÇÃO DO ERRO MÉDIO DA PREVISÃO DE SMZ E TMP, EM FUNÇÃO DA REGIÃO ESPECTRAL PROCESSADA E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES.	75
FIGURA 36.	ESPECTROS INFRAVERMELHOS (DRIFT) EM PRIMEIRA DERIVADA SEGUIDA DE ALISAMENTO DAS MISTURAS DE SMZ E TMP UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO MUTIVARIADO.	76
FIGURA 37.	GRÁFICO DE PRESS E VARIÂNCIA CAPTURADA PELAS VARIÁVEIS LATENTES NO MODELO DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDO COM ESPECTROS EM PRIMEIRA DERIVADA SEGUIDA DE ALISAMENTO.	77
FIGURA 38.	REPRESENTAÇÃO DO ERRO MÉDIO DA PREVISÃO DE SMZ E TMP, EM FUNÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES.(Tipos de pré-processamento: 1: sem, 2: derivado e alisado, 3: Autoescalonado, 4: MSC).	81
FIGURA 39.	ESPECTROS DAS 30 AMOSTRAS UTILIZADAS NOS ESTUDOS POR ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.	83
FIGURA 40.	GRÁFICO DE SCORES DA PC1 COM PC2.	84

FIGURA 41.	GRÁFICO DE LOADINGS DA PRIMEIRA COMPONTE PRINCIPAL.	84
FIGURA 42.	ESPECTROS DRIFT DAS AMOSTRAS REAIS E DE UMA MISTURA COM ÊNFASE NA REGIÃO ESPECTRAL DE 2360 cm^{-1} .	85
FIGURA 43.	ESPECTROS DRIFT DAS AMOSTRAS REAIS E DE UMA MISTURA COM ÊNFASE NA REGIÃO ESPECTRAL DE 2916 cm^{-1} .	86
FIGURA 44.	ESPECTROS DRIFT DAS AMOSTRAS REAIS E DE UMA MISTURA COM ÊNFASE NA REGIÃO ESPECTRAL DE 3545 cm^{-1} .	86

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABIMG:	ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS
ANVISA:	AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA
CLAE:	CROMATOGRAGIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
DPR:	DESVIO PADRÃO RELATIVO
DRIFTS:	ESPECTROSCOPIA INFRAVEMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA E TRANSFORMADA DE FOURRIER (<i>DIFUSE REFLECTANCE INFRARED FOURRIER TRANSFORMAT SPECTROSCOPY</i>)
FIOCRUZ:	FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INMETRO:	INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL.
IV:	INFAVERMELHO
MSC:	CORREÇÃO MULTIPLICATIVA DE SINAIS (<i>MULTIPLICATIVE SIGNAL CORRECTION</i>)
MID:	ESPECTROSCOPIA NO INFAVERMELHO MÉDIO
NIR:	ESPECTROSCOPIA NO INFAVERMELHO PRÓXIMO (<i>NEAR INFRARED</i>)
OPAS:	ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE
PA:	PRÓ ANALISE
PABA:	ACIDO PARA-AMINOBENZÓICO
PCA:	ANALISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (<i>PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS</i>)
PLSR:	REGRESSÃO DE MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (<i>PARTIAL LEAST SQUARE REGRESSION</i>)
PRESS:	SOMATÓRIO DOS QUADRADOS DOS ERROS DE PREVISÃO (<i>PREDECTIVE RESIDUAL ERROR SUM OF SQUARES</i>)
SMZ:	SULFAMETOXAZOL
TMP:	TRIMETOPRIM
USP:	FARMACOPÉIA NORTE AMERICANA (UNITED STATES PHARMACOPEIA)
UV-Vis:	ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA E VISÍVEL

RESUMO

Este trabalho é um exemplo do uso de ferramentas de calibração multivariada (regressão dos mínimos quadrados parciais, PLSR) na quantificação de sulfametoxazol (SMZ) e o trimetoprim (TMP) em formas farmacêuticas, utilizando-se espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis) e espectroscopia no infravermelho por refletância difusa (DRIFTS).

Estudos preliminares permitiram constatar a inconveniência dos processos de calibração univariados, em razão da interferência espectral observada na espectroscopia UV-Vis e da extrema complexidade dos sinais de DRIFT.

Modelos multivariados foram desenvolvidos a partir de espectros originais (UV-Vis), registrados entre 190 e 330 nm, e pré-processados por derivação-alisamento e autoescalamento. Os melhores resultados foram conseguidos com modelos desenvolvidos a partir de espectros originais, envolvendo o uso de oito variáveis latentes (VLs). Nestas condições, os parâmetros avaliados na validação foram realizados a partir de cinco misturas sintéticas, evidenciando erros de previsão inferiores a 3%, para ambas espécies em estudo. Na análise de medicamentos, algumas inconsistências foram observadas, principalmente devido à modificação do sinal espectral em função de variações de pH, estas últimas originadas, provavelmente, pela presença de excipientes diferenciados.

Nos estudos envolvendo DRIFT, modelos multivariados foram desenvolvidos em diversas regiões espectrais e utilizando-se diversos sistemas de pré-processamento de sinais. Na fase de validação, os melhores resultados foram conseguidos com modelos elaborados entre 7001 e 399 cm^{-1} , empregando-se 8 variáveis latentes e o sistema de correção multiplicativa de sinal (MSC). Nestas condições, erros de previsão inferiores a 5% foram obtidos para ambas espécies em estudo. Na análise de medicamentos, resultados insatisfatórios foram obtidos, principalmente devido às modificações espectrais introduzidas pela presença de excipientes. O efeito da presença destas espécies foi demonstrado por análise de componentes principais (PCA).

De maneira geral, os resultados demonstram uma boa capacidade preditiva dos modelos multivariados fundamentados em ambos tipos de espectroscopia. Para a análise de medicamentos, entretanto, há necessidade de se considerar a presença de excipientes, os quais deverão ser modelados junto com os fármacos de interesse.

ABSTRACT

In this work the use of multivariate calibration tools (partial least squares regression, PLSR) is proposed with the aim of make possible the quantification of sulfamethoxazole (SMZ) and trimethoprim (TMP) in antimicrobial pharmaceutical associations, using ultraviolet and visible absorption spectroscopy (UV-Vis) and diffuse reflectance infrared spectroscopy (DRIFTS).

In preliminary studies the inconvenience of univariate calibration processes was evidence, by reason of the spectral interferences observed in the UV-Vis spectroscopy and the extreme complexity of the DRIFTS' signals.

For UV-Vis spectroscopy, different models were developed using original spectra, registered between 190 and 330 nm, and pre-processing signals by derivation-smoothing and autoscalation. The best results were obtained by models developed with original spectra, involving the use of eight latent variables (VLs). In these conditions, the validation, carried out by the analysis of five synthetic mixtures, shown prediction errors lower than 3%, for both studied species. In the analysis of pharmaceuticals product some inconsistencies were observed, mainly due to the modification of the spectral sign in function of pH variations, probably originated by the presence of unlike excipients.

In studies involving DRIFT, multivariate models were developed in many spectra regions and using many pre-processing sign systems. In the validation phase, the best results were got with models elaborated between 7001 and 399 cm^{-1} , using eight latent variables and the multiplicative signal correction system (MSC). In these conditions, prediction errors lower than 3% were obtained for both species under study. In the analysis of pharmaceuticals product, similar results were obtained, mainly due to spectral modifications introduced by the presence of excipients. The effect of the excipients presence was confirmed by principal components analysis (PCA).

Broadly, the results demonstrated a good prediction capability of the multivariate models based in both kinds of spectroscopy. For the analysis of pharmaceuticals product, however, there is the need of consider the excipients presence, that will have to be modeled together with the principles of interest.

1. INTRODUÇÃO

A química analítica enfrenta com bastante frequência o desafio proveniente das mais variadas áreas da ciência, sempre no sentido de contribuir com o estabelecimento de metodologias analíticas cada vez mais sensíveis, seletivas, confiáveis e de menor custo. Esta procura por novas alternativas, tem propiciado o desenvolvimento de muitas técnicas analíticas instrumentais, grande parte das quais, além de representar um sólido avanço para a própria química analítica, tem sido fundamental para o desenvolvimento de muitas outras áreas da ciência.

Dentro deste contexto, destaca o desenvolvimento de rotinas analíticas orientadas a aplicações tradicionais, como o controle de qualidade de produtos industrializados, assim como o estabelecimento de técnicas que viabilizam objetivos menos evidentes, como à autenticação de obras de arte e objetos arqueológicos (LANG *et al.*, 2003) e à análise forense (CENGIZ *et al.*, 2004; GUNNAR *et al.*, 2004), dentre outras.

A análise química das espécies de interesse corresponde a um processo bastante complexo, devido a fatores limitantes representados pela necessidade de determinar quantidades cada vez menores, muitas vezes abaixo do limite de detecção oferecido pelas técnicas disponíveis, pelas interferências que derivam do caráter complexo de grande parte das matrizes utilizadas, e pela necessidade de diferenciar e quantificar diversas espécies químicas associadas a um mesmo produto (especificação). Estes inconvenientes têm representado um dos grandes desafios para a Química Analítica, propiciando os grandes avanços verificados na área.

Por motivos óbvios, o controle de qualidade de medicamentos reveste-se de grande importância, não apenas para aperfeiçoar e avaliar os processos de produção, mas principalmente para assegurar os padrões de qualidade que garantem a eficácia e segurança dos medicamentos. Deste ponto de vista, a disponibilização de metodologias analíticas confiáveis e, se possível, rápidas e de baixo custo, mostram-se extremamente importantes.

Na área de produção de medicamentos, a associação de dois ou mais fármacos é uma prática bastante freqüente, uma vez que pode otimizar o tratamento e melhorar a adesão do paciente à terapia prescrita. Nestes casos, a quantificação

de uma espécie, na presença de excipientes e princípios auxiliares, pode ser bastante complexa, o que geralmente obriga à utilização de técnicas cromatográficas, reconhecidamente demoradas e dispendiosas.

A espectroscopia eletrônica (UV-Vis) e a espectroscopia no infravermelho (IV) apresentam um conjunto de características que favorecem o seu uso em rotinas de análises químicas. Dentre outras, é possível destacar a sua simplicidade operacional, elevada velocidade analítica, baixo custo e possibilidades de uso em sistemas de controle *on-line*. Infelizmente, os freqüentes problemas de interferência espectral observados na espectroscopia UV Vis e a extrema complexidade de sinais espectroscópicos na região do infravermelho, representam sérias limitações na sua aplicabilidade.

Nos últimos anos, a calibração multivariada tem sido utilizada com sucesso no estabelecimento de metodologias analíticas fundamentadas em espectroscopia UV-Vis e no infravermelho. De maneira geral, observa-se que aproximações multivariadas permitem explorar toda a informação fornecida por estas técnicas instrumentais, o que favorece o desenvolvimento de modelos de calibração confiáveis, mesmo em situações de sobreposição espectral ou complexidade de sinal (COSCIONE, 2001). Embora exemplos de aplicação sejam abundantes, observa-se que na área de controle de qualidade de medicamentos as aplicações são bastante reduzidas.

Em função dos problemas levantados, teve-se como proposta o desenvolvimento de metodologias analíticas que contribuam para o controle de qualidade de medicamentos, associando técnicas espectroscópicas (UV-Vis e IV) com processos de calibração multivariada (Regressão de Mínimos Quadrados Parciais, PLSR). Como objeto de estudo foi selecionada a associação Sulfametoaxol (SMZ) e Trimetoprim (TMP), importantes fármacos utilizados no tratamento de doenças infecciosas.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1. FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

O Brasil tem muitas urgências, dentre elas, as relativas à inovação e ao desenvolvimento tecnológico, e principalmente à transformação do conhecimento produzido nos centros de ensino e pesquisa em valores econômicos e sociais, se destaca como uma das mais importantes. No meio industrial, caracterizado pela utilização de processos que permitem a transformação de matérias primas em produtos comercializáveis, esta interação se mostra fundamental para garantir a competitividade. Sendo assim, ciência, tecnologia e inovação são peças chaves que ligam conhecimento a desenvolvimento tecnológico, conseqüentemente ao crescimento econômico.

Entre os setores em que essas urgências nacionais se mostram ainda mais fortes e prementes está o da produção de fármacos e medicamentos. Os desafios para o setor não são poucos e a necessidade de congregar esforços, agregando valor, é das mais urgentes. A ação do Ministério da Saúde no setor de medicamentos não envolve apenas a distribuição destes para hospitais públicos e o controle da qualidade dos produtos vendidos nas farmácias. É um setor fundamental, com reflexos na indústria nacional, em políticas de pesquisa e desenvolvimento, nas universidades e na área de saúde pública (VOGT, 2004).

O Brasil ocupa o primeiro lugar no mundo em número de farmácias. São cerca de 60 mil lojas, o que corresponde a 3,6 lojas para cada 10 mil habitantes (OPAS, 2004). Embora a Organização Mundial da Saúde (OMS) não recomende um número fixo de farmácias (ou farmacêuticos) por grupo de habitantes, devido às diferentes realidades dos países, o Brasil ocupa a quinta colocação no ranking dos maiores consumidores de medicamentos do mundo, movimentando cerca de US\$ 5 bilhões por ano (ABIMG, 2004). Segundo Laporte (2004), muitos medicamentos são comercializados diariamente, sem qualquer utilidade, apenas para encobrir outros problemas complexos, muitos de origem social, ou graças a vigorosas campanhas publicitárias.

Nos últimos anos, o surgimento de medicamentos genéricos representou um dos mais importantes avanços na consolidação da política nacional de medicamentos, permitindo a ampliação do acesso da população a medicamentos.

Além disto, o medicamento genérico trouxe novas perspectivas para o mercado farmacêutico brasileiro e para a população, oferecendo alternativas terapêuticas econômicas, reduzindo os gastos das famílias e racionalizando os gastos públicos nas compras de medicamentos (BERMUDEZ, 1994; COM CIÊNCIA, 2004). Infelizmente, especialistas alertam para a queda na qualidade destes tipos de medicamentos, principalmente pela redução de incentivos para a venda de produtos de melhor qualidade (3M-BRASIL, 2004).

Em função do consumo excessivo e não orientado de medicamentos e do surgimento de produtos mais baratos, às vezes de qualidade duvidosa, a necessidade de um rigoroso controle de qualidade é bastante evidente (IVAMA et al., 2004).

A legislação brasileira, editada pelo Ministério da Saúde e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece prioridades e estratégias para a inspeção dos produtos farmacêuticos. De acordo com a Lei nº 6360 (art. 53), é responsabilidade da indústria, manter um responsável técnico habilitado para as diversas etapas da produção e distribuição dos produtos farmacêuticos. Embora exista obrigatoriedade no envio de relatórios ao Ministério da Saúde, esta estratégia nem sempre garante a qualidade ideal dos produtos, pois a fiscalização é precária e ineficiente. Para garantir a verdadeira procedência das matérias-primas e a veracidade dos efeitos destes produtos, faz-se necessário que os órgãos competentes pela fiscalização, órgão federal de saúde (Ministério da Saúde) ou do órgão estadual de Saúde (Secretaria Estadual de Saúde), cumpram os seus objetivos, fiscalizando e punindo os laboratórios que não estiverem de acordo com as exigências do Ministério da Saúde (BRASIL, 1976).

2.1.1. Associação Sulfametoxazol-Trimetroprim

Sulfametoxazol (SMZ) mostrado na Figura 1 é uma sulfonamida de amplo espectro. É um análogo estrutural do ácido para-aminobenzóico (PABA) e inibe de forma competitiva uma enzima bacteriana, a diidropteroato sintetase, que é responsável pela incorporação do PABA ao ácido diidrofólico (ácido fólico). Dessa forma, bloqueia a síntese do ácido diidrofólico e diminui a quantidade de ácido tetraidrofólico metabolicamente ativo (co-fator na síntese de purinas, timidina e DNA). As bactérias, ao contrário de células eucarióticas, não utilizam ácidos fólicos

pré-formados e necessitam sintetiza-lo a partir do PABA, por esta razão o sulfametoxazol se mostra eficiente no combate a microorganismos desta origem (FERNANDEZ DE CORDOVA *et al.*, 2003; PATEL, 2000).

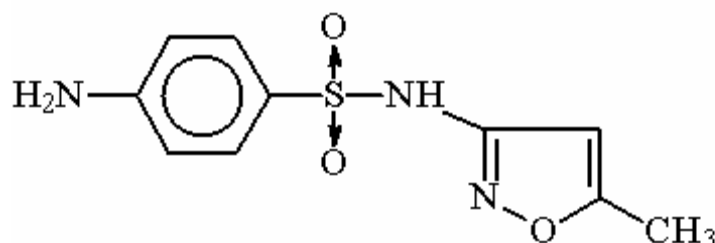


FIGURA 1. ESTRUTURA QUÍMICA DO SULFAMETOXAZOL.

O Trimetoprim (TMP), mostrado na Figura 2 é uma base fraca lipofílica, com ação bacteriostática, estruturalmente relacionada com a pirimetamina. Une-se reversivelmente à enzima bacteriana diidrofolato redutase, inibindo-a. Sua afinidade a essa enzima bacteriana é até 100.000 vezes maior que pela enzima humana equivalente. Exerce seu efeito num estado da biossíntese do folato imediatamente posterior ao estado em que atua o Sulfametoxazol, ocorrendo assim uma ação sinérgica entre ambos (FERNANDEZ DE CORDOVA *et al.*, 2003; AKAY *et al.*, 2002).

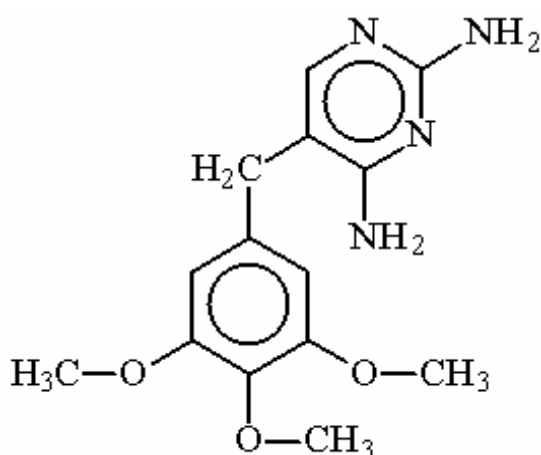


FIGURA 2. ESTRUTURA QUÍMICA DO TRIMETOPRIM.

A introdução da associação *Sulfametoxazol* + *Trimetoprim*, constitui importante avanço no desenvolvimento de fármacos antimicrobianos, clinicamente eficazes. Esta associação é indicada no tratamento de infecções do trato respiratório superior e inferior, tais como: exacerbações agudas de quadros crônicos de bronquite, faringite, sinusite, otite média aguda, tratamento e profilaxia (primária e secundária) da pneumonia por *Pneumocystis carinii* em adultos e crianças, é também eficaz no tratamento de infecções do trato urinário e renal, infecções gastrointestinais e outras infecções bacterianas (CCS, 2004).

Sulfametoxazol-Trimetoprim agem sinergicamente, bloqueando duas enzimas que catalisam estágios sucessivos na biossíntese do ácido folínico no microorganismo. Este tipo de ação é conhecido como antagonismo metabólico, que nada mais é do que uma inibição competitiva, sendo freqüentemente eficaz contra germes que são resistentes a um deles isoladamente. Por causa de seu mecanismo de ação, mostrado na Figura 3, o risco de resistência bacteriana é minimizado.

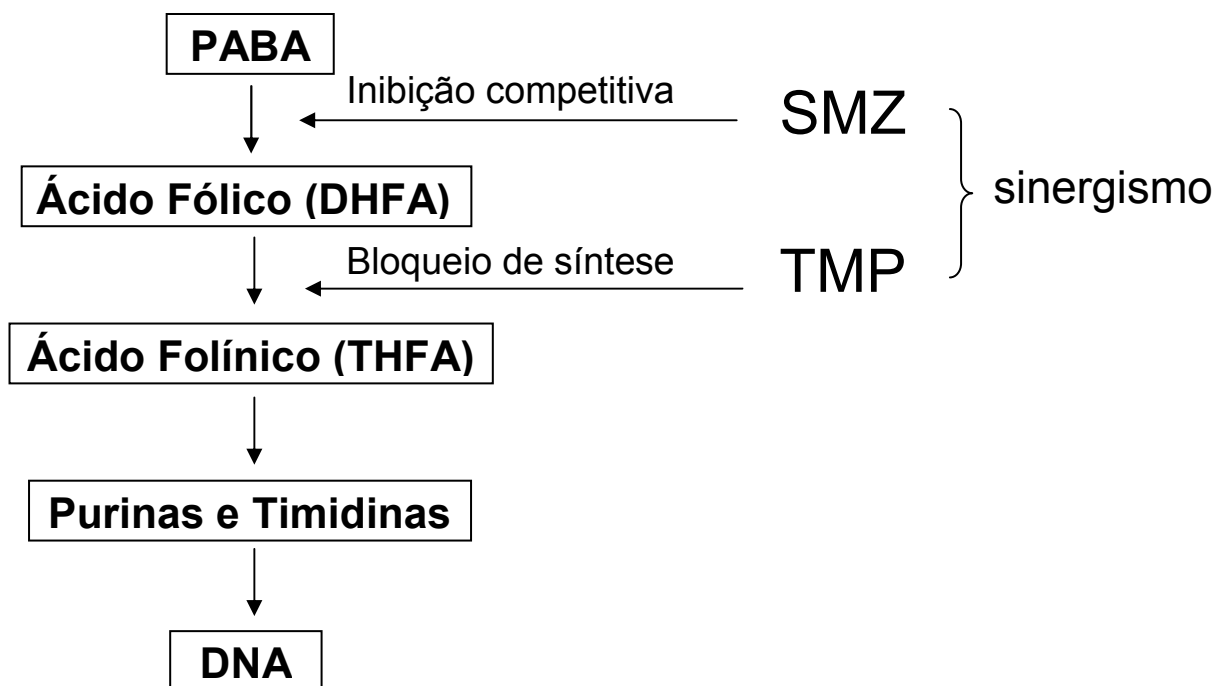


FIGURA 3. ETAPAS METABÓLICAS AFETADAS PELA AÇÃO DO SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIM.

2.2. ANÁLISE DE FÁRMACOS

As técnicas analíticas evoluem de acordo com as necessidades da época. Atualmente, por exemplo, existe um consenso universal a respeito da necessidade de se monitorar de forma contínua a produção de fármacos, de maneira a garantir o cumprimento das especificações pré-estabelecidas. Em função da seriedade que este tipo de controle reveste, grande parte das propostas analíticas está fundamentada em técnicas instrumentais modernas, muitas vezes demoradas e onerosas, dentre as que destacam a cromatografia líquida de alta eficiência (FURUSAWA, 2001; ZEEVI *et al.*, 2001), a cromatografia gasosa (SPEED *et al.*, 2001; WEIGEL *et al.*, 2001; SUNKERSETT *et al.*, 2001), a eletroforese capilar (AHRER *et al.*, 2001; DILLON *et al.*, 2000; ZAUGG *et al.*, 2001), e a espectrometria de ressonância magnética nuclear (LEHR *et al.*, 2003). Dada a própria natureza deste conjunto de técnicas instrumentais, as possibilidades de estabelecer um sistema de análise *on-line* são praticamente inexistentes, motivo pelo qual o controle de qualidade continua sendo universalmente aplicado a lotes do produto ou por amostragem, sendo as amostra selecionadas de acordo com critérios estatísticos.

Dentro do extenso grupo de fármacos é possível destacar, em função da massificação do seu uso, os antibióticos. Com o propósito de quantificar as espécies acima mencionadas, muitos procedimentos analíticos têm sido propostos. Infelizmente, em função da complexidade envolvida neste tipo de análise, principalmente por se tratar de uma associação de fármacos, grande parte das metodologias desenvolvidas está fundamentada em técnicas cromatográficas (LÖFFLER e TERNES, 2003; CROUBELS *et al.*, 2003; LEMUS GALLEGRO e PEREZ ARROYO, 2002), quimioluminescentes (POLÁEK e JAMBOR, 2002) e de eletroforese capilar (BERZAS NEVADO *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 1999), técnicas estas nem sempre disponíveis em laboratórios de pequeno ou médio porte ou, o que é mais preocupante, nos centros de controle e vigilância sanitária ligados ao governo.

Dentre as mais recentes metodologias analíticas propostas, são possíveis destacar a utilização de técnicas espectrofluorimétricas precedidas de derivatização com 2-acetilbutirolactona (SABRY, 2006), técnicas voltamétricas fundamentadas em processos de redissolução anódica (CARAPUÇA *et al.*, 2005) e diversas técnicas cromatográficas orientadas, principalmente, a quantificação dos fármacos em estudo

em amostras de resíduos e fluídos biológicos (LINDBERG *et al.*, 2004; MSAGATI e NINDI, 2004).

As normas estabelecidas pela ANVISA para a análise da associação em questão, são baseadas na Farmacopéia Brasileira, que sugere procedimentos analíticos que dependem da forma de apresentação do medicamento (comprimido, suspensão oral, injeção, outros). De maneira geral, as metodologias sugeridas são fundamentadas em técnicas cromatográficas ou espectroscópicas.

O limite de variação permitido na quantidade dos fármacos contidos nestes produtos também varia de acordo com a forma de apresentação, sendo aceitáveis valores aproximados de não menos que 90% e não mais do que 110% (USP, 2002).

2.3. ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

2.3.1. Espectroscopia Molecular na Região Ultravioleta e Visível

A espectroscopia UV-Vis apresenta um conjunto de características favoráveis, as quais deveriam garantir a sua condição de ferramenta analítica de primeira escolha. Trata-se de uma técnica consolidada, de fácil implementação, baixo custo e sensibilidade compatível com muitas das necessidades que surgem no controle de qualidade de produtos farmacêuticos. Infelizmente, a baixa seletividade faz com que a sua aplicabilidade fique seriamente comprometida, principalmente quando há necessidade de se analisar matrizes complexas.

Para contornar os problemas surgidos por esta falta de seletividade, muitas alternativas têm sido propostas. No entanto, grande parte delas está fundamentada na aplicação de processos de separação prévios (FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA *et al.*, 2003; AKAY, 2002), os quais acrescentam etapas que atentam contra a reprodutibilidade da determinação e na utilização de espectroscopia derivativa (LÓPEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2002; MORENO GÁLVEZ *et al.*, 2002; LEMUS GALLEG0 e PÉREZ ARROYO, 2001), útil na análise de amostras contendo 2 ou 3 componentes, e, menos freqüentemente, no uso de procedimentos de calibração multivariada.

As observações realizadas anteriormente podem ser facilmente visualizadas a partir dos espectros apresentados na Figura 4, onde os dois fármacos (SMZ e TMP) apresentam um sinal bastante intenso na região ultravioleta, o que faz com que a sua determinação *via* espectroscopia UV-Vis seja viável, mesmo em baixas

concentrações. A interferência espectral, entretanto, é bastante significativa, inviabilizando a determinação por meio de sistemas de calibração convencionais.

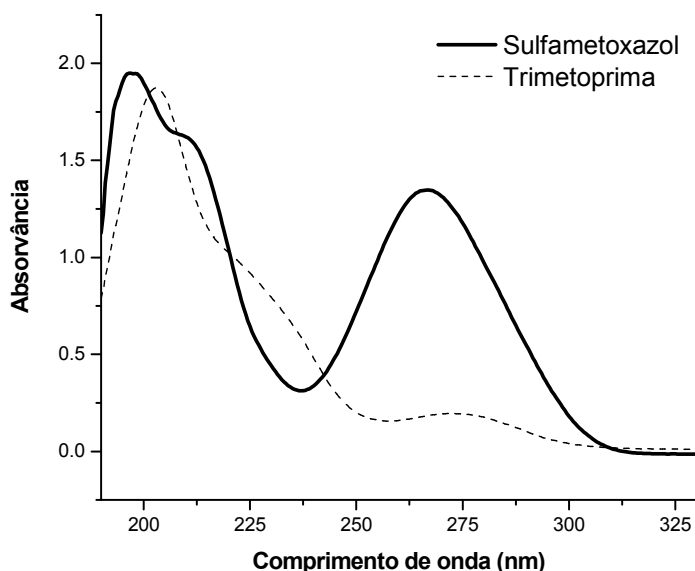


FIGURA 4. ESPECTROS DO SMZ (20 mg.L⁻¹) E TMP (16 mg.L⁻¹) EM SOLUÇÃO 5% ETANOL/ÁGUA (V/V).

Objetivando minimizar os efeitos de interferência, métodos derivativos têm sido propostos, normalmente envolvendo a primeira ou segunda derivada dos sinais espectroscópicos. Com a derivatização dos espectros os sinais sobrepostos são separados, o que minimiza a interferência e viabiliza determinações sem necessidade de procedimentos de separação prévia.

A espectrofotometria derivativa consiste na representação da razão da variação da absorvância com o comprimento de onda, em função do comprimento de onda. A diferenciação da lei de Lambert-Beer ($d^n A/d\lambda^n = cb(d^n a/d\lambda^n)$) mostra que as derivadas são sempre proporcionais às concentrações do analito (ROLLEMBERG, 2006).

A espectrofotometria derivativa é aplicada em diversas áreas da química, principalmente em análises de produtos alimentícios, como corantes, e em análises de fármacos, principalmente em produtos contendo dois a três componentes (ROLLEMBERG, 2006 e TORAL, 2002).

Lemus Gallego e Pérez Arroyo (2001) reportam uma metodologia espectrofotométrica derivativa, para a quantificação de misturas de Dexametasona, Polimixina B e Trimetoprim em associações farmacêuticas. Utilizando sinais espectroscópicos em primeira derivada, resultados consistentes foram encontrados.

Mais recentemente, Markopoulou *et al.* (2004) reportaram excelentes resultados na determinação de trimetoprim na presença de sulfametoxazol ou sulfametazina, recorrendo a metodologias espectrofotométricas derivativas.

2.3.2. Espectroscopia Infravermelho por Refletância Difusa

A região espectral do infravermelho compreende radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 12800 a 10 cm^{-1} . O espectro infravermelho é dividido em infravermelho próximo, médio e distante, conforme descrito na Tabela 1. Os métodos quantitativos no infravermelho diferem dos métodos espectroscópicos no ultravioleta/visível, devido à maior complexidade do sinal espectral, à menor largura das bandas e às limitações instrumentais dos aparelhos de infravermelho (SKOOG *et al.*, 2002).

TABELA 1. REGIÕES ESPECTRAIS DO INFRAVERMELHO

Região	Número de onda (cm^{-1})
Próximo	12800 a 4000
Médio	4000 a 200
Distante	200 a 10

A espectroscopia no infravermelho, principalmente no infravermelho próximo, tem sido utilizada com frequência pela indústria farmacêutica no controle de qualidade de produtos e no monitoramento do processo de produção (REICH, 2005; ÖZDEMİR e ÖZTURK, 2004).

A refletância difusa no infravermelho próximo tem se tornado a técnica instrumental de escolha para análises de proteína, gordura e açúcares. Os sinais espectrais de compostos orgânicos são geralmente dados por bandas de combinações, envolvendo vibrações das ligações C-H, O-H e N-H (OLINGER e GRIFFITHS, 1993).

A técnica que utiliza a reflexão difusa é conhecida como DRIFTS (Diffuse Reflection Infrared Fourier Transform Spectroscopy) (FULLER e GRIFFITHS, 1978), ocorrendo em superfícies não totalmente planas, podendo o substrato ser contínuo ou fragmentado (moído). A energia radiante incidente penetra na amostra interagindo com as substâncias e retorna à superfície após a absorção parcial e múltiplos espalhamentos. Na reflexão difusa, a energia é atenuada depois de entrar em contato diversas vezes com as partículas da amostra, fornecendo muitas informações analíticas sobre a mesma.

A luz difusa dá um espectro similar ao espectro de transmissão comum. Uma importante diferença entre a transmissão e a reflexão é devida ao diferente caminho ótico da luz. Enquanto na transmissão o caminho ótico é constante para todo comprimento de onda, na reflexão o caminho pode ser variável. Portanto, ao se comparar o espectro obtido por transmissão (pastilhas de KBr) com o obtido por reflexão, as intensidades relativas das bandas serão diferentes (SKOOG *et al.*, 2002).

Num experimento de reflexão difusa será também observada a reflexão especular, que ocorre na interface ar/superfície da matriz. A reflexão especular é de maior intensidade na região onde a amostra apresenta forte absorção, e neste caso, podem ocorrer severas distorções nos espectros obtidos (FERRÃO, 2001). Um esquema dos fenômenos de reflexão difusa e especular é apresentado na Figura 5.

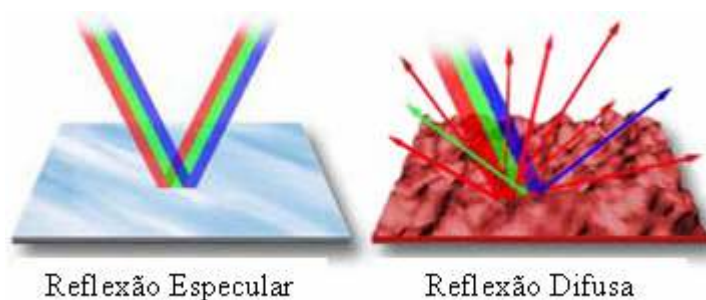


FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO DAS REFLEXÕES ESPECULAR E DIFUSA.

FONTE: DAVISON *et al.*, 2005.

As informações qualitativas estão relacionadas às energias absorvidas pelas moléculas, em comprimentos de onda específicos, enquanto que a intensidade espectral não é completamente proporcional à concentração dos compostos em

estudo. Para a retirada de informações quantitativas é preciso trabalhar matematicamente, seguindo funções e fórmulas complexas para esse fim.

Uma dessas funções, denominada de função de Kubelka Munk (equação 1), relaciona os espectros de refletância com a concentração de cada molécula presente na amostra, transformando o espectro de refletância difusa em formato semelhante ao espectro de absorbância. A equação de Kubelka Munk é usada para definir uma afinidade linear entre a intensidade da banda e a concentração da amostra na espectroscopia por refletância difusa (FERRÃO, 2001).

$$f(R_d) = (1 - R_d)^2 / 2 R_d \quad (1)$$

Onde: R_d é a refletância difusa.

De acordo com a teoria, $f(R_d)$ está relacionada com o coeficiente de absorção (K) e com o coeficiente de dispersão da superfície da amostra (S), expressa conforma a equação 2.

$$f(R_d) = K / S \quad (2)$$

O efeito do tamanho da partícula causa deslocamento da linha de base e se torna muito pronunciado em comprimentos de ondas de grande absorção pela amostra. Por exemplo, em duas amostras com mesma composição, mas diferente granulometria, há maior reflexão difusa nas partículas menores (MESSERSCHMIDT, 1999).

Até onde pudemos investigar, não existem relatos na literatura sobre a quantificação de misturas contendo sulfametoxazol e trimetoprim, por espectroscopia infravermelho. Os trabalhos mais próximos relatam a quantificação de diversas formas cristalinas de sulfametoxazol, utilizando espectroscopia infravermelho por refletância difusa na região do infravermelho próximo (PATEL *et al.*, 2000), e a caracterização de complexos metálicos de sulfametoxazol por espectroscopia infravermelho de transmissão no infravermelho médio (KESIMLI e TOPACLI, 2001).

2.4. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Um dos principais objetivos da calibração multivariada consiste em explorar toda a informação fornecida pela técnica instrumental utilizada, condição que favorece a previsão de uma resposta de interesse com discrepância mínima, mesmo em condições de severa interferência inter-espécies.

Métodos de calibração multivariada têm sido cada vez mais utilizados em química analítica, principalmente quando os componentes presentes em uma mistura necessitam ser determinados, mas a informação analítica disponível não apresenta seletividade (BRO, 2003; HOPKE, 2003). Isto é, quando em uma mistura não é possível identificar os componentes individuais, a partir da resposta instrumental.

A base da calibração multivariada é estabelecer uma relação entre duas matrizes (ou blocos) de dados químicos, quando houver uma dependência entre as propriedades que descrevem cada uma delas.

A calibração multivariada consiste basicamente de duas fases (MARTENS, 1989; FERREIRA *et al.*, 1999): a calibração e a previsão. Na fase de calibração, “n” espectros para um conjunto de amostras com composição conhecida são obtidos em “p” valores de energia (ou comprimento de onda) diferentes, formando uma matriz **Xcal**, com “n” linhas e “p” colunas. Também uma matriz **Ycal** com os valores de concentrações pode ser formada contendo “n” linhas, correspondendo às diferentes amostras, e “q” colunas, indicando o número de diferentes espécies de interesse presentes nas amostras.

O próximo passo é desenvolver um modelo matemático apropriado, determinando-se um vetor dos coeficientes de regressão (**b**) que melhor possa reproduzir **Ycal** a partir dos dados da matriz **Xcal** (equação 3). Esse modelo é utilizado na fase de previsão (com um conjunto teste) para estimar as concentrações (**Yprev**) dos constituintes de novas amostras, a partir de seus espectros (**Xteste**) (equação 4). Como estas metodologias trabalham com matrizes de dados, o processo de isolar o fator **Y** da equação 3 para a obtenção da equação 4, implica a utilização da matriz transposta de **X**, ou seja, **(Xteste)^t**.

$$Xcal = b \cdot Ycal \quad (3)$$

$$Y_{\text{teste}} = (X_{\text{teste}})^t \cdot b \quad (4)$$

Os dados para a calibração multivariada podem ser organizados conforme mostrado na Figura 6. Os valores de absorvância (ou transmitância) dos espectros, a cada valor de energia (ou comprimento de onda), são as variáveis independentes, e as concentrações das espécies de interesse nas amostras, as variáveis dependentes.

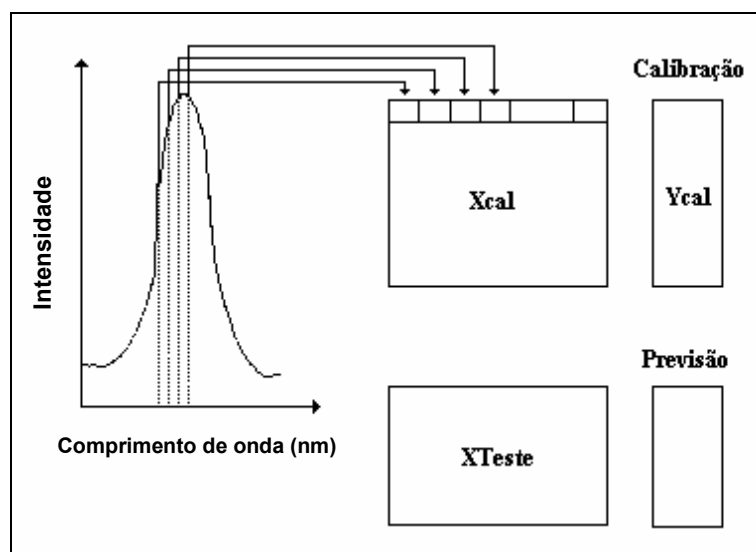


FIGURA 6. ORGANIZAÇÃO DOS DADOS PARA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.

FONTE: NAGATA, 2001.

2.4.1. Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR)

A Calibração Multivariada, fundamentada em técnicas de regressão parcial, corresponde a uma ferramenta poderosa para a química analítica, de interessante potencial de aplicação em muitos problemas de análise de fármacos (ARANCIBIA *et al.*, 2000; SENA *et al.*, 2001; MEDINA *et al.*, 1999). Em geral, este recurso permite a determinação de um componente de interesse em matrizes complexas ou a análise de multi-componentes em sistemas mais simples.

A base do método dos mínimos quadrados parciais (PLS) está na decomposição de uma matriz de dados \mathbf{X} , em termos da soma de várias matrizes \mathbf{M}_i , que não podem mais ser expandidas, mais uma matriz de erros (que corresponde a parte não modelada de \mathbf{X}). As matrizes \mathbf{M}_i constituem os chamados componentes

principais, e são formadas pelo produto de dois vetores, **t** (os *scores*) e **p** (os *loadings*) (ABDI, 2003; FERREIRA *et al.*, 1999):

$$\begin{aligned} X &= M_1 + M_2 + \dots + M_a + E \quad \text{ou,} \\ X &= t_1 p_1 + t_2 p_2 + \dots + t_a p_a + E \quad \text{ou,} \\ X &= TP' + E \end{aligned} \tag{5}$$

A dimensionalidade do espaço original é igual ao número de colunas em **X**, ou seja, o número de variáveis originais. No novo modelo, a dimensionalidade é descrita pelo número de matrizes **M_i** necessárias para descrever **X**. Assim, se for possível descrever uma matriz **X** que tenha muitas variáveis, por um número pequeno dessas matrizes **M_i**, haverá um decréscimo na dimensionalidade, sem perda de informação relevante.

No PLS, tanto a matriz das variáveis independentes **X**, como a das variáveis dependentes **Y**, são representadas pelos *scores* e *loadings*:

$$X = TP' + E \tag{6}$$

$$Y = UQ' + F \tag{7}$$

Uma relação entre as duas matrizes de dados **X** e **Y** pode ser construída, correlacionando-se os *scores* de cada bloco, utilizando um modelo linear:

$$\begin{aligned} u_a &= b_a t_a \quad \text{ou,} \\ U &= bT \end{aligned} \tag{8}$$

Métodos de calibração multivariada têm sido utilizados com bastante frequência na resolução de problemas de interferência espectral. No caso da espectrofotometria UV-Vis., os exemplos são abundantes e atestam o grande potencial dos processos de calibração multivariada para a resolução deste tipo de problemas, sem a necessidade de recorrer a metodologias químicas, freqüentemente associadas à contaminação ou perda da amostra de interesse. Neste sentido, destacam os bons resultados conseguidos na determinação

espectrofotométrica de fármacos (BOERIS *et al.*, 2000; CRIADO *et al.*, 2000; BENAMOR *et al.*, 2000).

Recentemente, Ni *et al.* (2006) demonstraram a capacidade das ferramentas de calibração multivariada para a quantificação de misturas de sulfametoxazol e trimetoprim por espectroscopia UV-Vis. De maneira geral, boa capacidade preditiva foi conseguida por modelos de calibração desenvolvidos por regressão de mínimos quadrados parciais, com erros de previsão entre 2 e 10%. Cabe salientar que, até onde pudemos investigar, esta é a única aplicação de ferramentas multivariadas na determinação dos fármacos sulfametoxazol e trimetoprim.

2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Para que uma nova proposta analítica possa ser utilizada com segurança há necessidade de se realizar uma série de ensaios específicos, orientados a avaliar a sua confiabilidade. O conjunto de avaliações que fazem parte desta operação é denominado de validação (RIBANI *et al.*, 2004).

Órgãos nacionais e internacionais têm estabelecido diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os resultados de uma análise são confiáveis. No entanto, não é possível estabelecer um sistema universal de validação, devido à grande variedade de substâncias, métodos equipamentos e suas complexidades. Assim, torna-se importante um bom planejamento, em que sejam avaliados os requerimentos legais e o método analítico escolhido.

De modo geral, os parâmetros a serem analisados na validação de um método correspondem a especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade e exatidão. Entretanto, o conjunto de testes depende do objetivo da metodologia proposta, o qual configura as categorias abaixo indicadas, conforme relacionado na Tabela 2 (ANVISA, 2003).

- Categoria I: Testes quantitativos para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas;
- Categoria II: Testes quantitativos ou ensaio limite para determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas;

- Categoria III: Testes de desempenho (Ex: dissolução, liberação do ativo);
- Categoria IV: Testes de identificação.

TABELA 2. ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE ACORDO COM A SUA FINALIDADE.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão (repetibilidade)	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico;

** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária.

FONTE: ANVISA, 2003.

2.5.1 Especificidade e Seletividade

Entende-se por especificidade a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003). Isso corresponde à capacidade de um método de não apresentar resultados falso-positivos, quando da identificação de uma substância, por exemplo.

De acordo com Leite (2002), os procedimentos para demonstrar a especificidade dependerão do objetivo do procedimento analítico, e devem ser o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método.

Para análises quantitativas (teor) e análises de impurezas, este parâmetro pode ser avaliado pela incorporação à matéria-prima ou ao produto acabado, sob exame de níveis apropriados de impureza ou excipientes, demonstrando-se que o resultado não é afetado pela presença destes compostos. Outra maneira é comparar os resultados do teste com os de um segundo método validado e bem caracterizado (ANVISA, 2003).

Os termos seletividade e especificidade são muitas vezes utilizados indistintamente ou com interpretações diversas, mas, de acordo com o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) (2003), seletividade e especificidade não são sinônimos. Um método específico é aquele capaz de determinar apenas um analito presente na matriz, e seletivo é aquele capaz de determinar e distinguir cada um dos vários analitos presentes.

2.5.2 Intervalo

Para qualquer método quantitativo, existe um intervalo de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado. O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (ANVISA, 2003). A idéia é de que o método deve apresentar linearidade, exatidão e precisão quando as quantidades do analito encontrem-se dentro de um determinado intervalo. Conforme o tipo de ensaio, diferentes intervalos podem ser especificados (ANVISA, 2003):

- Para a determinação quantitativa de matéria-prima ou produtos acabados: normalmente de 80% a 120% da concentração teórica do teste;
- Para a determinação de impurezas: do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado;
- Para ensaio de uniformidade de conteúdo: de 70% a 130% da concentração teórica do teste;
- Para ensaios de dissolução: $\pm 20\%$ sobre o valor especificado no intervalo.

2.5.3 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (INMETRO, 2003).

A linearidade pode ser avaliada pela inspeção visual de gráfico construído pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes, conforme intervalo especificado pelo tipo de ensaio. Se houver relação linear aparente, os resultados devem ser avaliados por métodos estatísticos apropriados, como a regressão linear pelo método de mínimos quadrados. As grandezas observadas podem ser o coeficiente de correlação, o coeficiente de determinação, a intersecção com o eixo Y, o coeficiente angular e o desvio padrão relativo (ANVISA, 2003; ICH, 1996). O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser igual a 0,99 de acordo com a ANVISA (2003) e 0,90 de acordo com o INMETRO (2003).

2.5.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico representa a proximidade dos resultados por meio dele obtidos em relação ao valor verdadeiro. Quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (INMETRO, 2003).

Várias metodologias de avaliação da exatidão estão disponíveis (ANVISA, 2003):

- Matérias-primas (fármacos). Pela aplicação da metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou pela comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida.
- Produtos acabados (forma farmacêutica). Pela análise de uma amostra em que quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) ou, na indisponibilidade de todos os componentes do medicamento, a análise pelo método de adição de padrão, em que se adiciona quantidade conhecida do analito (padrão de referência) ao medicamento.

A exatidão é calculada como percentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, conforme fórmula abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica (real)}} \times 100 \quad (9)$$

A exatidão deve ser determinada a partir de no mínimo 9 (nove) determinações, contemplando-se o intervalo linear do procedimento e as regiões de baixa, média e alta concentração, com 3 (três) réplicas cada uma (ANVISA, 2003).

2.5.5 Precisão

A precisão representa a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla, de uma mesma amostra (ANVISA, 2003). A precisão pode ser considerada em três níveis (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003; ICH, 1996):

- Repetibilidade (Precisão intra-corrida): grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições de repetibilidade – mesmo procedimento de medição realizado pelo mesmo analista e instrumentação, dentro de um curto período de tempo. A repetibilidade pode ser verificada pela avaliação de um mínimo de 9 (nove) determinações em um mínimo de 3 (três) níveis de concentração, de acordo com o intervalo especificado, ou num mínimo de 6 determinações a 100% da concentração teste.
- Precisão Intermediária (Precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados de um mesmo laboratório.
- Reprodutibilidade (Precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes. Embora a reprodutibilidade não

seja um componente de validação de métodos executados por um único laboratório, é considerada um parâmetro importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação a outros laboratórios.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas, não devendo ultrapassar 5% de variação. O desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) é obtido segundo a fórmula:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100 \quad (10)$$

Onde: DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada.

2.5.6 Robustez

A robustez é a medida da capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (ANVISA, 2003). Um método é dito robusto quando se revela praticamente insensível a variações que possam ocorrer quando está sendo executado. Constatando-se a suscetibilidade do método a determinadas variações, estas deverão ser declaradas como precauções e controladas durante a execução do procedimento. A Tabela 3 traz os fatores que devem ser considerados na determinação da robustez de um método analítico.

TABELA 3. FATORES QUE DEVEM SER CONSIDERADOS NA DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO.

Preparo das amostras	Estabilidade das soluções analíticas Tempo de extração
Espectrofotometria	Variação do pH da solução Temperatura Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	Variação do pH da fase móvel Variação na composição da fase móvel Diferentes lotes ou fabricantes de colunas Temperatura Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas Temperatura Velocidade do gás de arraste

FONTE: ANVISA, 2003.

3. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo principal estudar a potencialidade dos processos de calibração multivariada, especialmente Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR), no sentido de viabilizar a determinação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprim em formas farmacêuticas *via* espectroscopia eletrônica (UV-Vis) e espectroscopia infravermelho com refletância difusa e transformada de Fourier (DRIFTS).

Em função deste objetivo geral, surgem os objetivos específicos descritos a seguir:

- i. Desenvolvimento de modelos de calibração multivariada (PLSR), utilizando-se espectroscopia UV-Vis e DRIFTS a partir de misturas sintéticas de padrões de sulfametoxazol e trimetoprim.
- ii. Testar a capacidade de previsão, em relação a misturas sintéticas de diferentes concentrações, dos modelos desenvolvidos.
- iii. Validação dos modelos desenvolvidos, em relação à análise de medicamentos que contém a associação estudada.
- iv. Comparação da previsão dos modelos multivariados com valores obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAIS E REAGENTES

Os fármacos utilizados neste estudo foram Sulfametoxazol (**SMZ**: 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazolil) benzenossulfonamida) e Trimetoprima (**TMP**: 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-2,4-pirimidinodiamina), ambos fornecidos pelo laboratório farmacêutico Far-Manguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz, com grau de pureza de 99%.

Etanol (98,9%), Acetonitrila (grau HPLC), trietilamina (grau HPLC) Metanol (grau HPLC), foram utilizados como recebidos.

Outros reagentes (ácidos, bases e solventes), foram de grau analítico PA.

A água deionizada foi de qualidade ultra pura.

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se vidraria analítica, incluindo balões, buretas e pipetas volumétricas previamente calibradas.

4.2. EQUIPAMENTOS

Todas as pesagens foram realizadas em balança analítica digital Scientech AS 210 ($\pm 0,0001$).

Espectros de absorção UV-Vis foram adquiridos em espectrofotômetro Shimadzu (2410 PC), utilizando-se o software UVPC v.3.91 (Shimadzu) e cubetas de quartzo de 1 cm.

Para as análises envolvendo DRIFTS utilizou-se espectrofotômetro Excalibur, modelo FTS-4000 Bio-Rad, equipado com acessório de refletância difusa. Os espectros foram adquiridos com resolução de 4 cm^{-1} , acumulando-se 128 varreduras.

A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi realizada em um Cromatógrafo Varian Pró-Star, equipado com coluna C18 (CHROMPACK) e detector UV (213 nm). Como fase móvel foi utilizada uma mistura de acetonitrila (222 mL), água deionizada (777 mL) e trietilamina (1,1 mL), com vazão de 1 mL min^{-1} . Curvas de calibração individuais foram preparadas a partir de padrões USP (United States Pharmacopeia).

4.3. PROGRAMAS COMPUTACIONAIS

Para a montagem de matrizes de dados utilizou-se o software Origin Pro 6.1[®], enquanto que para a elaboração dos modelos empregou-se o pacote PLS-toolbox 1.5, que opera em ambiente Matlab v.4.2 e Matlab v.6.5.

4.4. METODOLOGIA

4.4.1. Desenvolvimento de modelos de calibração por espectroscopia UV-Vis em solução

4.4.1.1. Modelos univariados convencionais

Para o desenvolvimento de modelos univariados convencionais foram elaboradas curvas analíticas individuais, no comprimento de onda de máxima absorção apresentado por cada fármaco. Cada curva analítica foi composta de 6 valores de concentração, cobrindo-se a faixa de 10,0 a 27,0 mg L⁻¹ para sulfametoxazol, e de 2,0 a 5,0 mg L⁻¹ para o trimetoprim.

As soluções foram preparadas por dissolução direta dos substratos, em solução etanol:água 5% (v/v).

Modelos univariados foram também elaborados no modo derivativo. Neste caso, curvas de calibração para sulfametoxazol foram elaboradas nos comprimentos de onda em que o trimetoprim apresenta uma derivada da absorvância igual a zero. O mesmo procedimento foi utilizado para a elaboração das curvas de calibração do trimetoprim.

4.4.1.2. Modelos multivariados

Para o desenvolvimento de modelos de calibração multivariada foram produzidas 25 misturas, contendo 18,00 a 22,00 mg L⁻¹ de sulfametoxazol e 3,00 a 5,00 mg L⁻¹ de trimetoprim, dissolvidas em solução etanol:água 5% (v/v), conforme o planejamento de experimentos apresentado na Figura 7. Esta faixa de trabalho foi definida levando-se em consideração o teor nominal dos fármacos presentes nos medicamentos comercialmente disponíveis, com a variação máxima de $\pm 10\%$. O modelo multivariado foi desenvolvido utilizando-se 20 misturas, sendo que as 5

misturas restantes, selecionadas aleatoriamente, foram reservadas para a fase de validação.

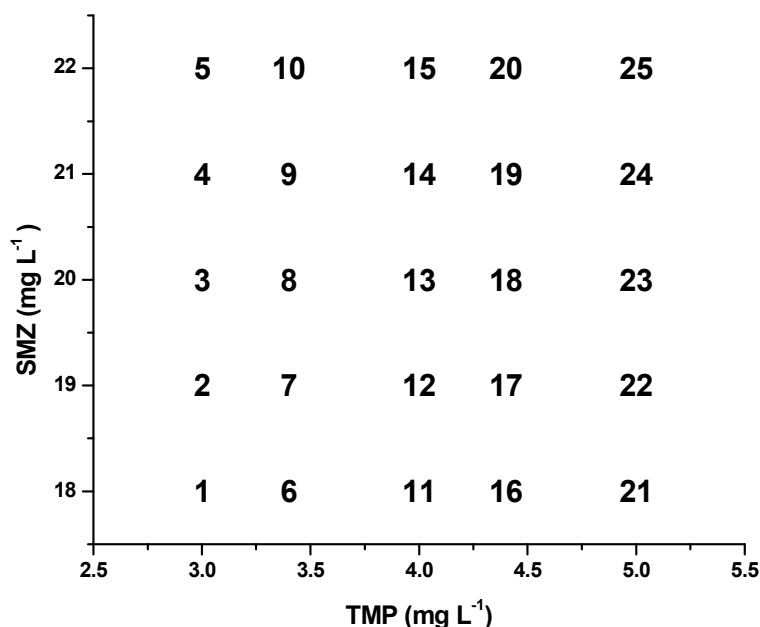


FIGURA 7. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA DESENVOLVIMENTO DE MODELOS MULTIVARIADOS POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.

Os espectros foram registrados entre 190 e 400 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico, sendo processados integralmente, eliminando-se, apenas, regiões sem informação relevante. Para elaboração de todos os modelos multivariados, os dados espectrais foram centrados na média (translação do sistema de origem até o centro do conjunto de dados), visando facilitar a visualização, bem como reduzir a dimensão do modelo construído. Este tipo de pré-processamento consiste, basicamente, na subtração do valor de cada elemento da coluna (x_{ij}) pelo valor médio dos elementos dessa coluna (x_{mj}), obtendo-se como resultado uma matriz onde toda a coluna tem média zero (THOMAS, 1994). Este pré-processamento foi realizado utilizando-se o software Matlab.

Para verificar uma melhora na eficiência dos modelos multivariados envolvendo espectroscopia UV-Vis, alguns procedimentos de transformação de dados foram utilizados. São estes:

- i) Primeira derivada: processada com o software Origin Pro 6.1., principalmente para melhorar a separação de sinais não totalmente sobrepostos.
- ii) Alisamento: processado com o software Origin Pro 6.1., pelo método SAVITZKY-GOLAY (SAVITZKY e GOLLAY, 1994) para diminuição de ruídos espectrais.
- iii) Autoescalamento: processado com o pacote PLS-Toolbox 1.5 em ambiente Matlab 4.2., principalmente para evidenciar sinais de menor intensidade.

O primeiro critério utilizado para seleção do número de variáveis latentes (VL), a serem utilizadas na obtenção dos modelos de calibração, corresponde à minimização do PRESS (Somatório dos Quadrados dos Erros de Previsão), parâmetro resultante do procedimento de validação cruzada (sistema *leave-one-out*). Neste procedimento, uma das amostras do conjunto de calibração é excluída da fase de desenvolvimento do modelo, sendo reservada como elemento de previsão. Este processo é repetido n vezes, de maneira a permitir que todos os padrões de calibração (n) participem como elementos de previsão. Finalmente, o erro de previsão é obtido comparando-se a concentração prevista para cada padrão com o seu valor verdadeiro, indicado na matriz de concentração. A somatória dos quadrados dos erros de previsão (PRESS) é definida como:

$$\text{PRESS} = \sum (y' - y)^2 \quad (11)$$

Onde: y' é o valor conhecido e y é o valor calculado.

Adicionalmente, e objetivando-se evitar o desenvolvimento de modelos superestimados, utilizou-se o critério do menor número possível de variáveis latentes, excluindo-se aquelas responsáveis por parcelas pouco significativas da variância total.

Após uma seleção preliminar, fundamentada nos critérios acima mencionados, modelos foram desenvolvidos com 19, 8, 5, 3 e 2 VLs, utilizando-se como critério final de seleção a capacidade de previsão, expressa na forma de erro médio de previsão.

Após elaboração dos modelos, a presença de anomalias (*outliers*) no conjunto de calibração foi avaliada utilizando-se os critérios de Resíduos de Students e Leverage. Os resíduos de Student indicam se as amostras estão incluídas na

distribuição normal, considerando-se um intervalo de confiança de 95%, enquanto que o leverage representa a distância entre cada espectro e o centróide do conjunto de espectros. No primeiro caso observa-se um valor limite de 2,5, enquanto que no segundo, um valor de $3 \text{ VL} / n$, em que VL corresponde ao número de variáveis latentes e n ao número de amostras utilizadas.

4.4.1.2.1. Validação do Modelo multivariado

A partir da análise comparativa dos modelos de calibração desenvolvidos com misturas dos padrões de SMZ e TMP, o melhor modelo foi validado segundo critérios estabelecidos pela ANVISA. Os indicadores foram intervalo, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), robustez (tempo de leitura, temperatura e influência do pH) e exatidão.

a. Intervalo

A definição da faixa de trabalho do modelo multivariado deve considerar a concentração mediana do conjunto de calibração, modelando então pontos de concentração ao redor desse valor, atingindo um limite de + 20% e – 20% (ANVISA, 2003). No caso das misturas contendo sulfametoxazol e trimetoprima, o ponto central corresponde às concentrações de 20,00 mg L⁻¹ de sulfametoxazol e 4,00 mg L⁻¹ de trimetoprima. Portanto, a variação de 20% configura o intervalo de 18,00 a 22,00 mg L⁻¹ para sulfametoxazol e de 3,00 a 5,00 mg L⁻¹ para trimetoprima.

b. Precisão

Para avaliação da precisão foram realizados ensaios de repetibilidade (intra-corrida) e reprodutibilidade (inter-corridas). Para tais ensaios foram preparadas 3 misturas, em concentração baixa (18,0 mg L⁻¹ de SMZ e 3,0 mg L⁻¹ de TMP), média (20,0 mg L⁻¹ de SMZ e 4,0 mg L⁻¹ de TMP) e alta (22,0 mg L⁻¹ de SMZ e 5,0 mg L⁻¹ de TMP), as quais foram analisadas em triplicata. O teste de reprodutibilidade foi viabilizado pela participação de um segundo analista (Estagiária Marília S. Kellner), em dia e equipamento diferentes.

A precisão foi expressa na forma de desvio padrão relativo, considerando-se satisfatórios valores inferiores a 5% (ANVISA, 2003).

c. Robustez

A avaliação da robustez envolveu estudos orientados a verificar o efeito do tempo de leitura (0, 2, 24 e 48h), da temperatura (5, 15, 25, 35 e 50 °C) e pH (4,7; 5,6 e 6,4 - sem solução tampão).

d. Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação. As misturas utilizadas para o ensaio de recuperação foram as mesmas empregadas na avaliação da precisão. A exatidão foi expressa na forma de erro percentual, considerando-se satisfatórios valores de recuperação entre 98 e 102% (ANVISA, 2003).

4.4.2. Desenvolvimento de modelos de calibração por espectroscopia infravermelho com refletância difusa

Para o desenvolvimento de modelos de calibração multivariada foram produzidas 25 misturas, contendo 560 a 830 mg g⁻¹ de sulfametoxazol e 113 a 168 mg g⁻¹ de trimetoprima (ver planejamento em Figura 8).

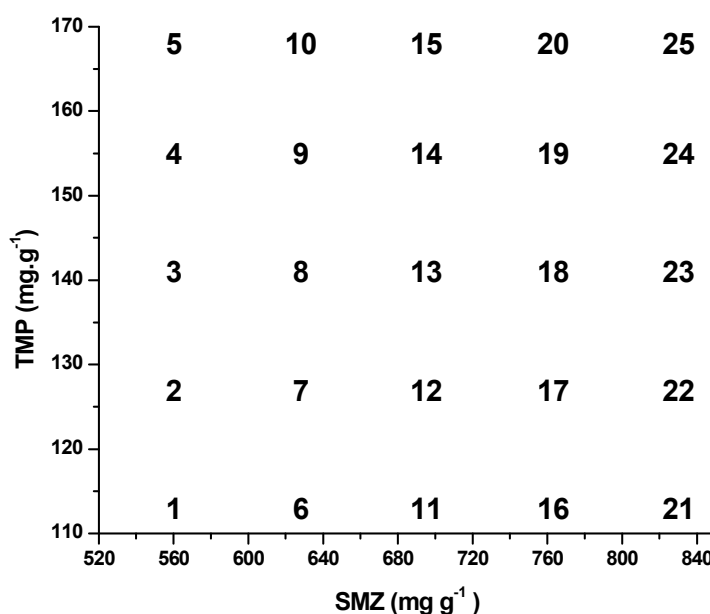


FIGURA 8. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA DESENVOLVIMENTO DE MODELOS MULTIVARIADOS POR ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA.

Esta faixa de trabalho foi definida levando-se em consideração o teor nominal dos princípios ativos em medicamentos comercialmente disponíveis. Os espectros foram processados integralmente, apenas separando as regiões do infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) e do infravermelho próximo (7000 a 4000 cm^{-1}). Para elaboração de todos os modelos multivariados, os dados espectrais foram centrados na média.

Para verificar e tentar melhorar a eficiência dos modelos multivariados, pré-processamentos fundamentados em derivação, alisamento e autoescalamento foram aplicados. Destaque especial deve ser dado ao pré-processamento por Correção do Efeito Espalhamento Multiplicativo (MSC), originalmente desenvolvido para corrigir as variações do espalhamento de luz, em medidas de refletância difusa no infravermelho próximo, mas sabe-se que o MSC faz a correção da linha de base dos espectros.

Para cada amostra o espalhamento é estimado em relação ao de uma amostra de referência, neste caso, o espectro obtido pela média dos 20 padrões de calibração. Cada espectro é corrigido de forma que todas as amostras tenham o mesmo nível de espalhamento da amostra de referência. Essa correção assume que o coeficiente de espalhamento é o mesmo para todos os comprimentos de onda, ignorando-se variações devidas a variações químicas.

A versão MSC é baseada em um simples modelo linear, conforme mostra a equação 12:

$$x = a + bx' + e \quad (12)$$

Onde x representa o espectro da amostra, x' o espectro da amostra de referência, a representa as informações químicas em x e "e" são os resíduos.

Para cada amostra, a e b são estimados pela regressão dos mínimos quadrados e o espectro corrigido, x_c , para cada comprimento de onda é calculado como segue, na equação 13 (FERRARINI, 2004):

$$x_c = (x - a) / b \quad (13)$$

Para aplicação deste tipo de tratamento foi utilizado o programa Matlab v. 6.5.

4.4.3. Análise de amostras reais

Para validação dos modelos desenvolvidos, amostras de medicamentos foram analisadas. Além do medicamento de referência (Bactrim do Laboratório Roché) outras associações também foram estudadas, tais como: Neotrin, Qiftrim, Bac-Sulftrim, Infectrin e amostras manipuladas no Laboratório Far-manguinhos da FIOCRUZ. Todas as amostras contêm 400 mg de SMZ e 80 mg de TMP por comprimido.

Na análise por espectroscopia UV-Vis, 10 comprimidos foram triturados em almofariz e o equivalente a massa média de um deles foi dissolvido em 1000,0 mL de solução aquosa de etanol (5% v/v). Após a filtração, 5,0 mL desta solução foram diluídos até 100 mL, utilizando-se a mesma solução aquosa de etanol. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Na análise por DRIFTS, 10 comprimidos foram triturados em almofariz e quantidades suficientes foram colocadas no porta-amostras, para leitura direta do medicamento em fase sólida.

4.4.4. Análise por CLAE

As soluções padrão foram preparadas com padrões USP, em concentrações de 1,60 mg mL⁻¹ (SMZ) e 0,32 mg mL⁻¹ (TMP). As curvas de calibração foram elaboradas a partir destas soluções, em concentrações entre 0,128 e 0,208 mg mL⁻¹ para SMZ e 0,0256 e 0,0416 mg mL⁻¹ para TMP. As amostras foram preparadas triturando-se 10 comprimidos de cada medicamento, pesando-se o equivalente a 80 mg de SMZ e diluindo-se em 50 mL de metanol, previamente sonificado por 5 minutos. Após filtração em membrana de 45 µm, 1 mL desta solução foi transferida para um balão de 10 mL, diluindo-se com fase móvel.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ESPECTROSCOPIA UV-VIS EM SOLUÇÃO

5.1.1. Análise Convencional Univariada

Para SMZ duas curvas analíticas foram preparadas, utilizando-se as regiões de absorção máxima centradas em 198,5 e 265,5 nm (Figura 9A). Embora elevados valores de absorvância tenham sido registrados na faixa de concentração selecionada, as curvas analíticas mostram-se lineares, com coeficientes de regressão de 0,9999 e 0,9996, respectivamente (Figura 9B). A este respeito, é importante salientar que o procedimento adotado para a análise de amostras reais foi elaborado de maneira a garantir um sinal de absorvância significativo para o componente presente em menor concentração (TMP). Uma vez que grande parte dos medicamentos que contém a mistura em análise apresenta uma formulação de 400 mg de SMZ e 80 mg de TMP, por comprimido, garantir um valor de absorvância mensurável para TMP implicou em extrapolar o sinal (absorvância maior que 1) correspondente a SMZ. Mesmo assim, a linearidade observada garante a inexistência de erros significativos associados a esta prática.

Para TMP o procedimento foi análogo (Figura 10A), desta vez utilizando-se dois comprimentos de onda de máxima absorção (203,5 e 284,0 nm) e dois ombros localizados em uma região de interferência mínima (225,0 e 236,0 nm). A linearidade das curvas analíticas (Figura 10B) é bastante inferior às apresentadas para SMZ, principalmente em função de problemas de reprodutibilidades no preparo de padrões de concentração muito próxima e muito baixa.

Os resultados obtidos na análise de misturas sintéticas, aplicando-se o sistema convencional de interpolação nas curvas analíticas de melhor desempenho, são apresentados na Tabela 4. Como era de se esperar, os erros são extremamente elevados, principalmente para o componente que se apresenta em menor concentração (TMP). Neste caso, a forte interferência espectral do SMZ provoca erros positivos, cuja magnitude demonstra a inviabilidade deste procedimento univariado convencional.

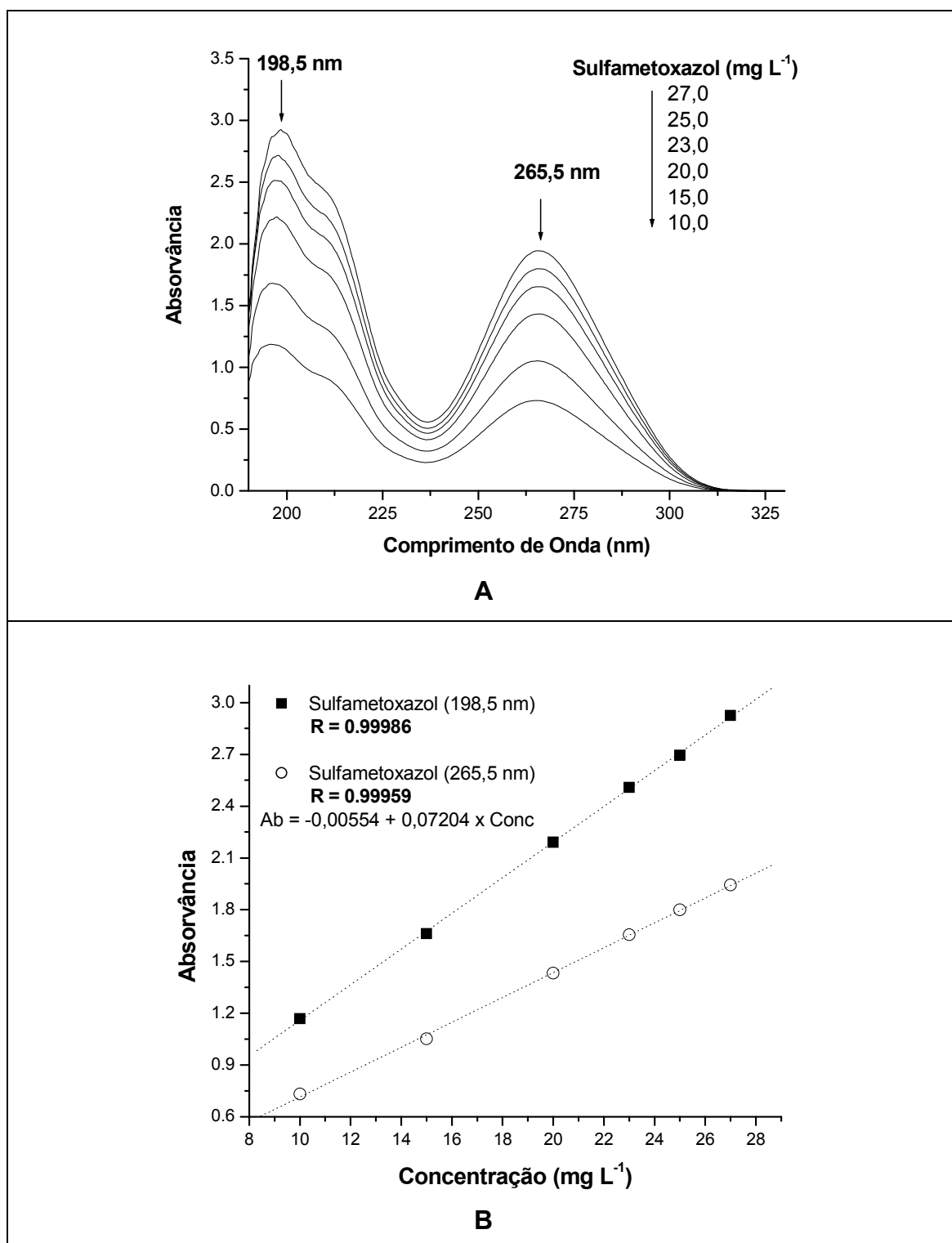


FIGURA 9. ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS DO SMZ (A) E CURVAS ANALÍTICAS, ABSORVÂNCIA X CONCENTRAÇÃO DE SMZ (B).

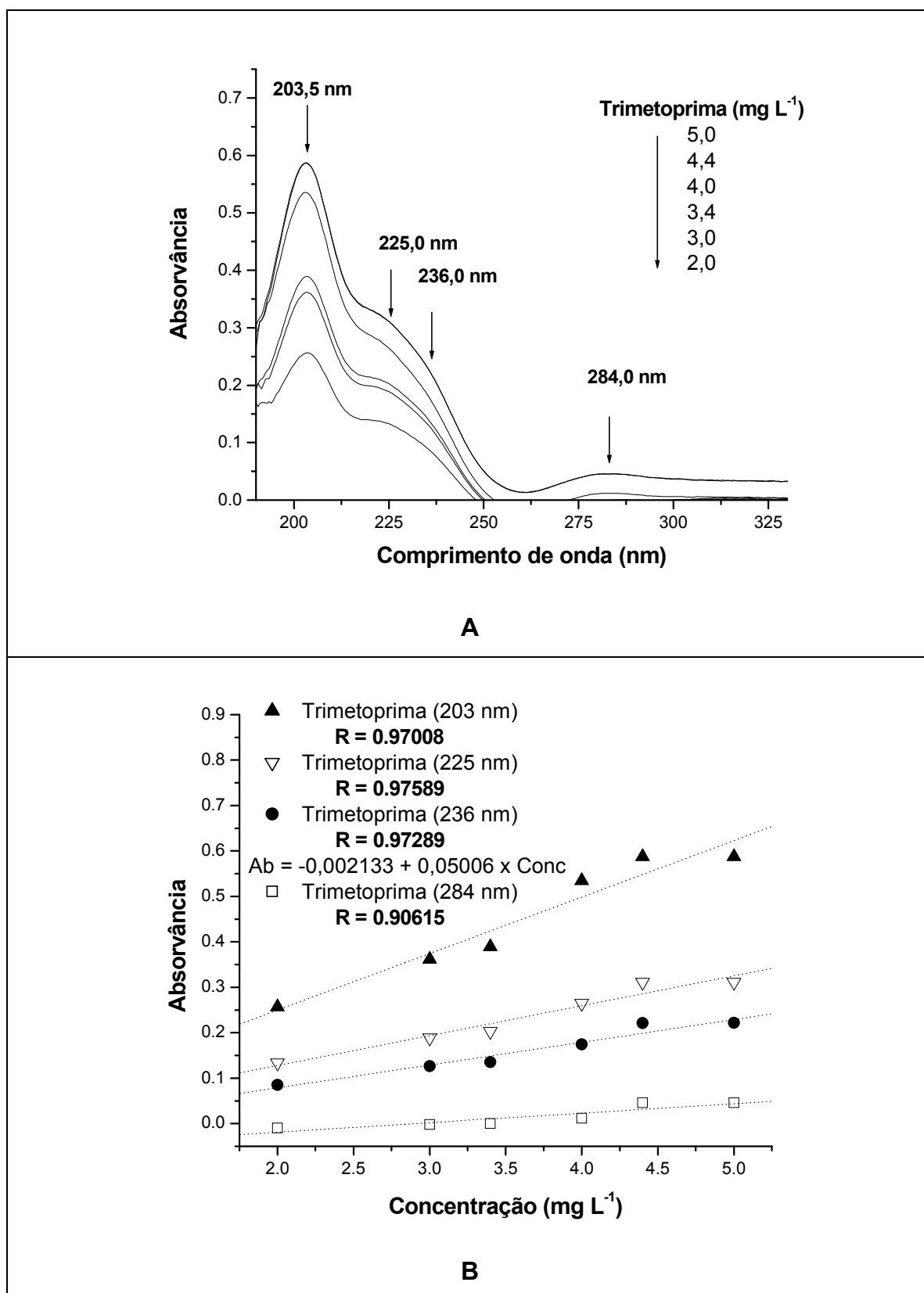


FIGURA 10. ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS DO TMP (A) E CURVAS ANALÍTICAS, ABSORVÂNCIA X CONCENTRAÇÃO DE TMP (B).

TABELA 4. RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES OBTIDAS PELO MÉTODO DE INTERPOLAÇÃO NA CURVA ANALÍTICA DOS ESPECTROS ORIGINAIS.

Amostra	Concentração real (mgL ⁻¹)		Concentração encontrada (mg L ⁻¹)		Erro (%)	
	SMZ	TMP	SMZ (265,5nm)	TMP (236,0nm)	SMZ	TMP
2	19,0	3,0	15,9	11,4	-16,3	266,7
9	21,0	3,4	18,1	12,8	-13,8	276,4
17	19,0	4,4	16,8	16,4	- 11,6	272,7
20	22,0	4,4	19,1	17,5	-13,2	297,7
23	20,0	5,0	17,8	17,3	-11,0	246,0
Erro Médio (%)					13,2	271,9

5.1.2. Espectrofotometria Derivativa

Visando contornar os problemas de interferência espectral, os espectros de absorção UV-Vis foram processados em primeira derivada. Uma rápida observação dos espectros derivados (Figuras 11 e 12), e uma comparação com os espectros não processados (Figuras 9 e 10), permite verificar o surgimento de comprimentos de onda em que a derivada da absorvância é igual a zero. Em princípio, curvas analíticas para SMZ podem ser construídas no ponto de derivada zero do TMP (203,5 nm), assim como curvas para TMP podem ser elaboradas nos dois pontos de derivada zero do SMZ (236,5 e 266,0 nm), com um mínimo de interferência. Infelizmente, valendo-se deste artifício, denominado método do ponto de anulação, os sinais processados apresentam magnitudes bastante reduzidas, o que diminui significativamente a linearidade das curvas analíticas (Figura 11B e 12B).

Os resultados obtidos na análise de misturas sintéticas, aplicando-se o sistema de interpolação nas respectivas curvas analíticas, são apresentados na Tabela 5. Embora o procedimento adotado permita reduzir significativamente os erros originados pela interferência espectral, observa-se uma correção incompleta,

principalmente em razão da perda de linearidade observada no processamento de sinais de baixa intensidade.

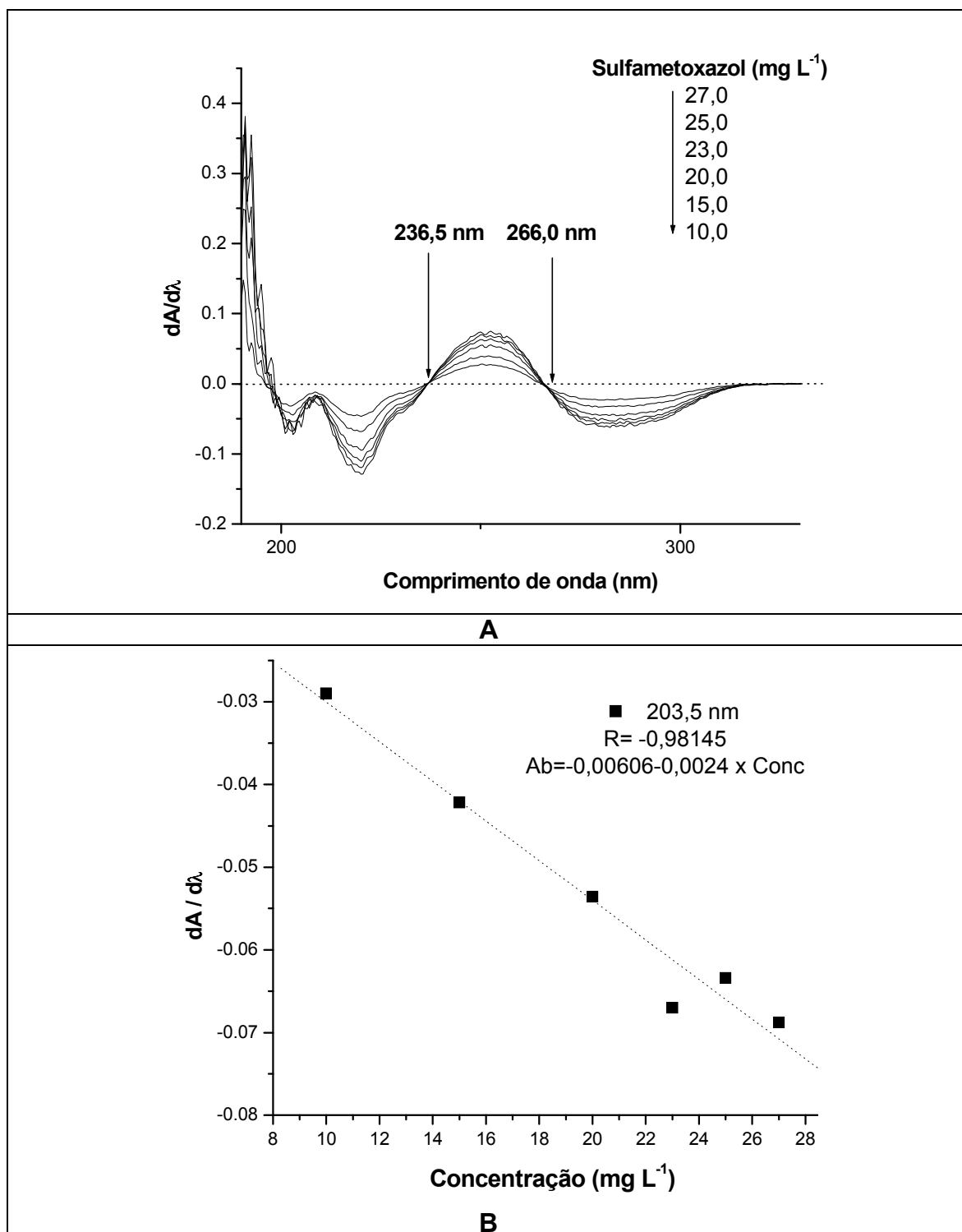


FIGURA 11. PRIMEIRA DERIVADA DOS ESPECTROS DE SMZ (A) E CURVA ANALÍTICA (203,5 nm), $dA/d\lambda$ X CONCENTRAÇÃO DE SMZ (B).

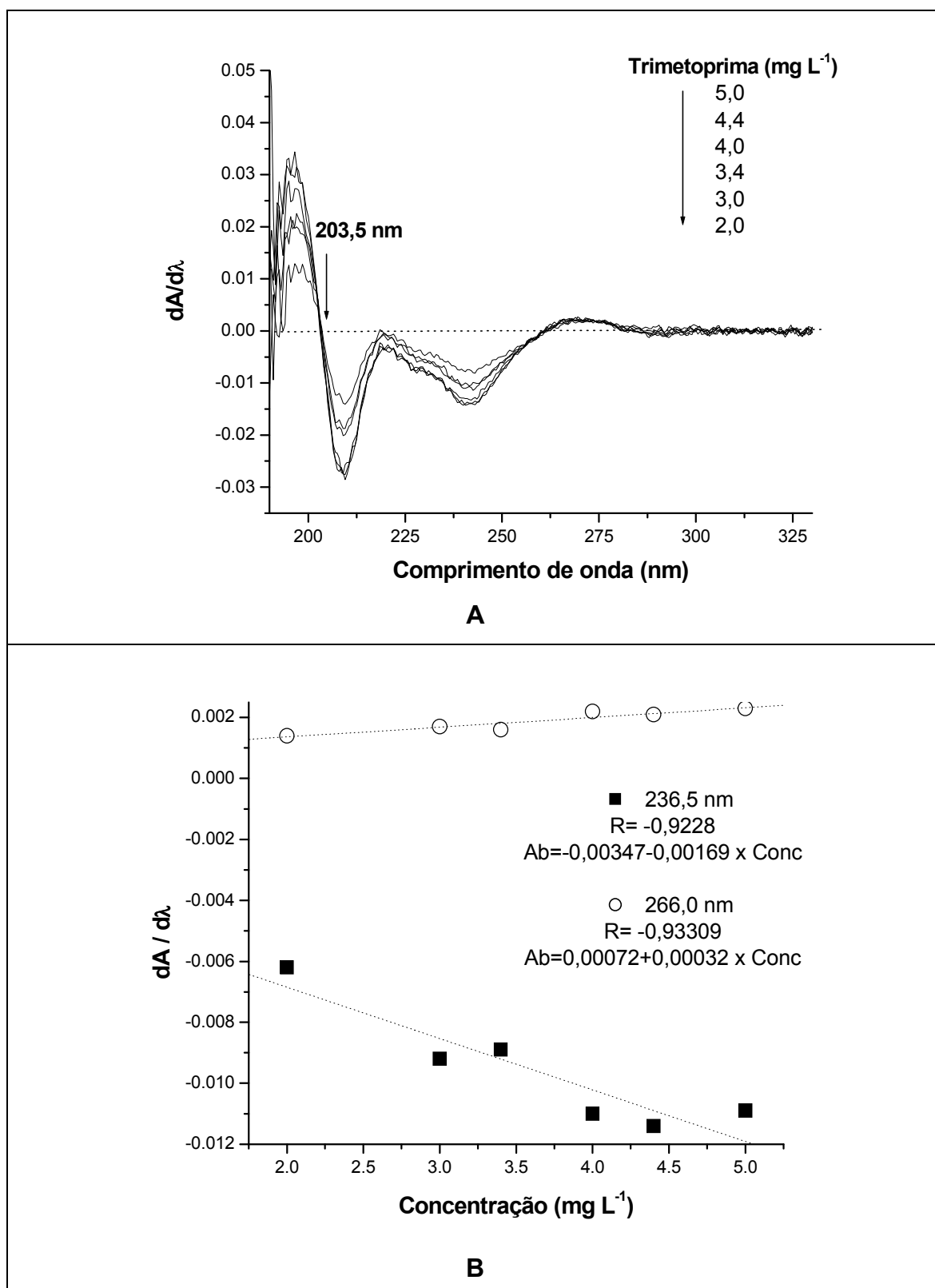


FIGURA 12. PRIMEIRA DERIVADA DOS ESPECTROS DE TMP (A) E CURVAS ANALÍTICA (236,5 E 266,0 nm), $dA/d\lambda$ X CONCENTRAÇÃO DE TMP (B).

TABELA 5. RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES OBTIDAS PELO MÉTODO DE INTERPOLAÇÃO NA CURVA ANALÍTICA EM PRIMEIRA DERIVADA.

Amostra	Concentração real (mg L ⁻¹)		Concentração encontrada (mg L ⁻¹)		Erro (%)	
	SMZ	TMP	SMZ (203,5nm)	TMP (236,5nm)	SMZ	TMP
2	19,0	3,0	13,6	3,5	- 28,2	17,0
9	21,0	3,4	16,1	3,4	- 23,5	0
17	19,0	4,4	14,9	7,5	- 21,4	69,8
20	22,0	4,4	16,9	7,2	- 23,2	63,1
23	20,0	5,0	9,4	8,4	- 53,3	68,4
Erro Médio (%)					- 29,9	44,0

5.1.3. Método da aditividade espectrofotométrica

Finalmente, para complementar os procedimentos ditos “convencionais” e contornar os já comentados problemas de interferência espectral, sistemas fundamentados no princípio da aditividade das absorvâncias foram também desenvolvidos, de acordo com a seqüência de expressões apresentadas a seguir:

$$A(265\text{ nm}) = A(\text{SMZ}_{265\text{ nm}}) + A(\text{TMP}_{265\text{ nm}})$$

$$A(236\text{ nm}) = A(\text{SMZ}_{236\text{ nm}}) + A(\text{TMP}_{236\text{ nm}})$$

Ou:

$$A(265\text{ nm}) = (a_{\text{SMZ}, 265\text{ nm}} \times C_{\text{SMZ}}) + (a_{\text{TMP}, 265\text{ nm}} \times C_{\text{TMP}})$$

$$A(236\text{ nm}) = (a_{\text{SMZ}, 236\text{ nm}} \times C_{\text{SMZ}}) + a_{\text{TMP}, 236\text{ nm}} \times C_{\text{TMP}}$$

Onde:

A: Absorvância, a :absortividade (L mg⁻¹cm⁻¹), C: concentração (mg L⁻¹)

Registrando-se os valores de absorvância para a mistura de substratos, em ambos comprimentos de onda, e conhecendo-se os valores de absortividade, é possível calcular as concentrações, resolvendo-se um sistema de duas equações.

Os resultados, apresentados na Tabela 6, demonstram a ineficiência deste procedimento, para a correção de interferência espectral tão severa quanto a envolvida neste estudo. A este respeito, cabe salientar que referida interferência se torna ainda mais crítica, em razão da desigualdade na concentração das espécies em estudo.

TABELA 6. RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES OBTIDAS PELO MÉTODO DA ADITIVIDADE DE ABSORVÂNCIAS.

Amostra	Concentração real (mgL ⁻¹)		Concentração encontrada (mgL ⁻¹)		Erro (%)	
	SMZ	TMP	SMZ	TMP	SMZ	TMP
2	19,0	3,0	15,7	5,1	17,4	68,8
9	21,0	3,4	17,8	5,7	15,1	66,8
17	19,0	4,4	16,3	10,6	14,3	140,3
20	22,0	4,4	18,6	10,7	15,5	143,3
23	20,0	5,0	17,3	11,1	13,6	122,7
Erro Médio (%)					15,2	108,4

5.1.4. Comentários Sobre as Alternativas Espectroscópicas Convencionais

Os resultados, sumarizados na Tabela 7, demonstram claramente as dificuldades encontradas na análise convencional de substratos mutuamente interferidos.

Normalmente, a utilização de sistemas de equações, fundamentados no princípio da aditividade da absorvância, permite contornar problemas de interferência espectral, em sistemas contendo dois ou três componentes. Neste caso, o sistema não viabilizou a determinação desejada, principalmente em razão das grandes

diferenças de concentração entre ambas espécies em estudo. Nestas condições, pequenos desvios que possam afetar o sinal do substrato mais concentrado tornam-se extremamente significativos, influenciando severamente o sinal correspondente à espécie menos concentrada.

No caso do estudo em primeira derivada, o método utilizado procura eliminar erros sistemáticos provenientes de interferências específicas, mas é bastante sensível a pequenas alterações na posição da banda interferente.

Os elevados erros de previsão observados servem de justificativa para o desenvolvimento de modelos multivariados de calibração, os quais comumente permitem eficiente previsão, mesmo na presença de elevada interferência espectral.

TABELA 7. RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES, NAS ANÁLISES DE MISTURAS SINTÉTICAS CONTENDO SMZ E TMP, POR DIFERENTES PROCESSOS DE CALIBRAÇÃO CONVENCIONAL.

Amostra	Concentração Real (mg L ⁻¹)		Concentração Método 1 (mg L ⁻¹)		Concentração Método 2 (mg L ⁻¹)		Concentração Método 3 (mg L ⁻¹)	
	SMZ	TMP	SMZ	TMP	SMZ	TMP	SMZ	TMP
2	19,0	3,0	15,9	11,4	13,6	3,5	15,7	5,1
9	21,0	3,4	18,1	12,8	16,1	3,4	17,8	5,7
17	19,0	4,4	16,8	16,4	14,9	7,5	16,3	10,6
20	22,0	4,4	19,1	17,5	16,9	7,2	18,6	10,7
23	20,0	5,0	17,8	17,3	9,4	8,4	17,3	11,1
Erro médio (%)			13,2	271,9	- 29,9	44,0	15,2	108,4

LEGENDA: 1: Resultado de interpolação em curvas analíticas individuais.
 2: Resultado de interpolação em curvas de primeira derivada.
 3: Resultado do sistema de aditividade de absorvâncias.

5.1.5. Análise Espectrofotométrica Multivariada

5.1.5.1. Espectrofotometria com Espectros Originais

O modelo multivariado de calibração foi estabelecido a partir de 20 misturas sintéticas, selecionadas aleatoriamente a partir das 25 misturas apresentadas na Figura 6. As 5 misturas restantes foram reservadas para a fase de previsão, que visa avaliar a capacidade preditiva dos modelos. A composição de cada mistura pode ser visualizada na Tabela 8.

TABELA 8. COMPOSIÇÃO DAS MISTURAS UTILIZADAS NAS ETAPAS DE CALIBRAÇÃO (NORMAL) E VALIDAÇÃO (NEGRITO) NO DESENVOLVIMENTO DE MODELOS MULTIVARIADOS UTILIZANDO-SE ESPECTROSCOPIA UV-VIS EM SOLUÇÃO.

Misturas	SMZ (mg L ⁻¹)	TMP (mg L ⁻¹)
1	18,0	3,0
2	19,0	3,0
3	20,0	3,0
4	21,0	3,0
5	22,0	3,0
6	18,0	3,4
7	19,0	3,4
8	20,0	3,4
9	21,0	3,4
10	22,0	3,4
11	18,0	4,0
12	19,0	4,0
13	20,0	4,0
14	21,0	4,0
15	22,0	4,0
16	18,0	4,4
17	19,0	4,4
18	20,0	4,4
19	21,0	4,4
20	22,0	4,4
21	18,0	5,0
22	19,0	5,0
23	20,0	5,0
24	21,0	5,0
25	22,0	5,0

A extrema semelhança entre os espectros das misturas sintéticas, utilizadas na fase de calibração e validação, pode ser observada na seqüência de espectros apresentada na Figura 13.

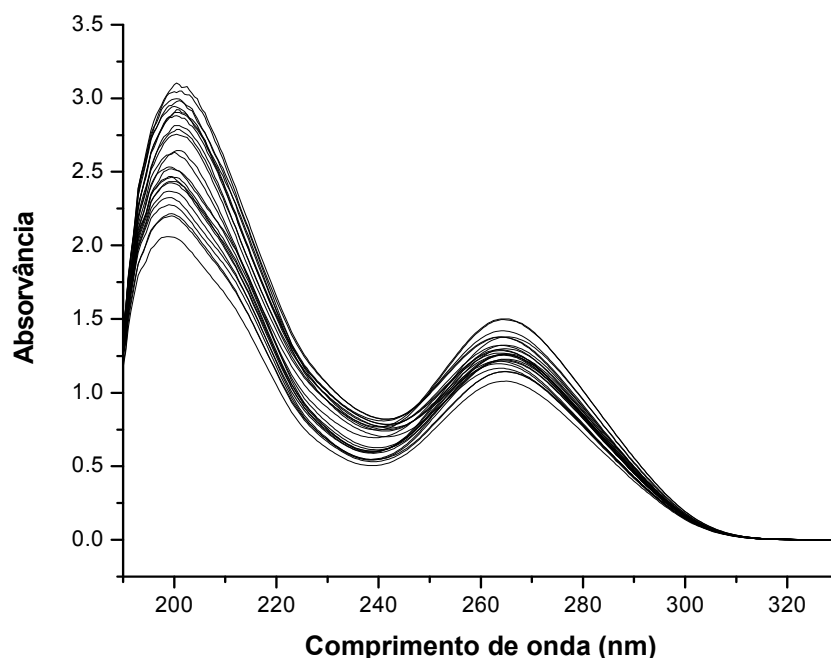


FIGURA 13. ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS DAS MISTURAS DE SMZ E TMP UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO MUTIVARIADO.

Para definir o melhor número de variáveis latentes (VLs), utilizou-se o método de validação interna cruzada, particularmente a rotina denominada "Leave one out". Neste procedimento, um espectro é retirado do conjunto de calibração, sendo utilizado como elemento de previsão. Esta operação é repetida tantas vezes quanto necessário, de maneira a garantir que todos os elementos do conjunto participem como elemento de previsão. Os erros que surgem desta previsão são apresentados como somatória do seu quadrado (PRESS), em função do número de VLs (Figura 14).

A partir destes antecedentes, é possível observar que 19 variáveis latentes são necessárias para descrever o modelo que leva aos menores erros de previsão. Entretanto, percebe-se que o erro de previsão não diminui significativamente a partir

da décima VL, ao mesmo tempo em que grande parte da variância dos dados de concentração pode ser representada por apenas 5 a 7 VLs. Sendo assim, modelos foram construídos com o número máximo de variáveis recomendadas por PRESS (19), as quais foram sistematicamente reduzidas, de maneira a simplificar o modelo desenvolvido. Os resultados (Tabela 9), indicam que, tal como esperado, um número reduzido de VLs leva à elaboração de um modelo com capacidade de previsão similar àquele desenvolvido com um grande número de VLs, o que representa uma vantagem que confere robustez ao modelo desenvolvido. Dentro deste contexto, cabe salientar que o uso de um elevado número de VLs costuma provocar superajustes do modelo, o que faz com que pequenas variações de tipo instrumental possam provocar significativa perda na capacidade de previsão.

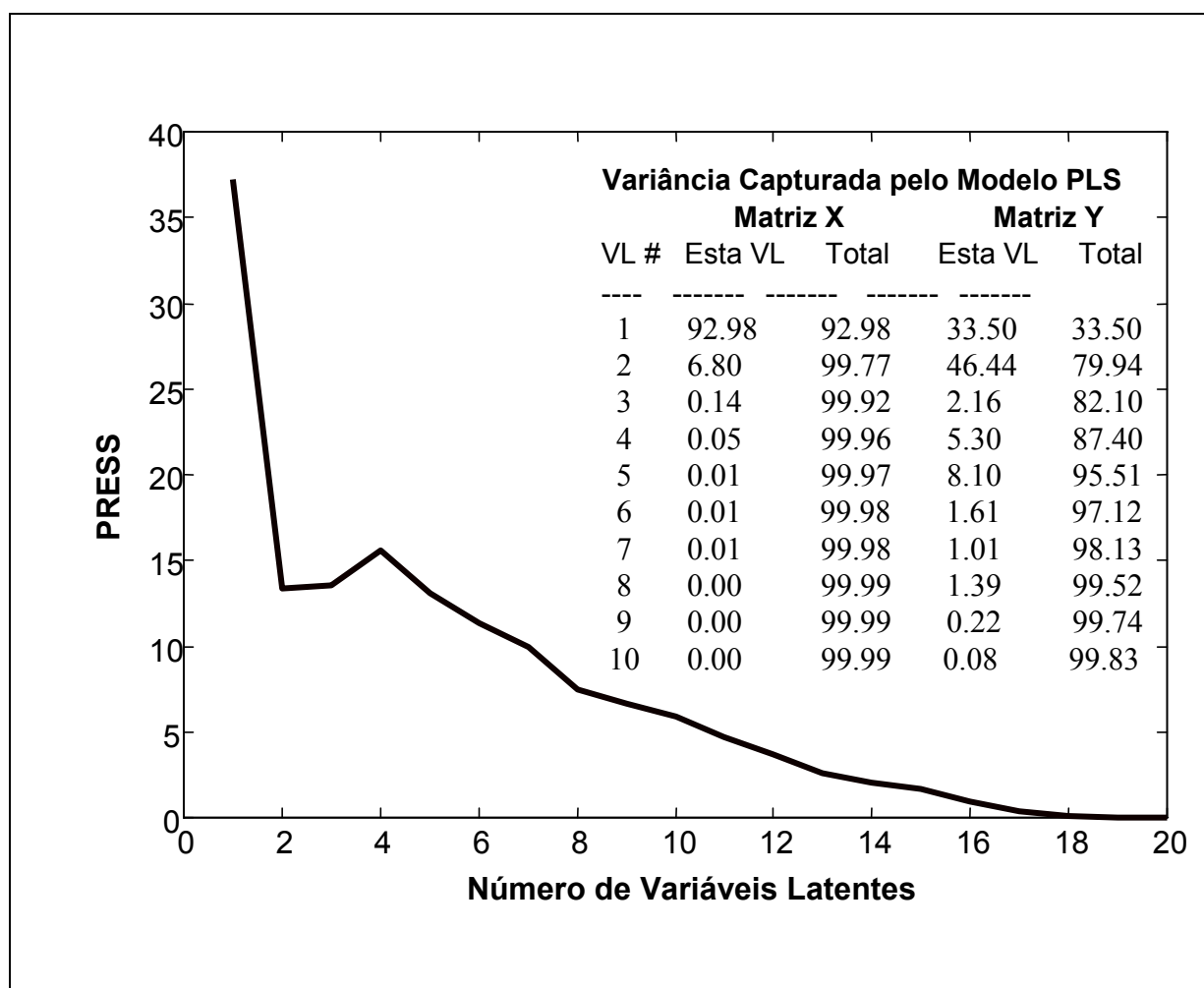


FIGURA 14. GRÁFICO DO SOMATÓRIO DOS ERROS DE PREVISÃO (PRESS) VERSUS NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES.

É interessante salientar que cada amostra do conjunto é representada por aproximadamente 260 valores de absorvância, registrados em igual número de valores de comprimento de onda. A primeira etapa do procedimento multivariado demonstra que grande parte da variância dos dados pode ser representada por um pequeno número de novas variáveis (VLs), as quais surgem da combinação linear das variáveis originais. Se um pequeno número de VLs é utilizado para representar a variância registrada nos espectros, o desenvolvimento de um modelo de calibração fica extremamente facilitado.

No gráfico que mostra os coeficientes de correlação, utilizando-se 8 VL's, para cada variável original (Figura 15), observa-se que praticamente toda a região monitorada se correlaciona com a concentração das espécies em estudo. Fica claro que, por se apresentar em maior concentração relativa, sulfametoxazol (em preto) apresenta correlações mais intensas. Para trimetoprim (em cinza) a correlação é bastante discreta e completamente centrada na região ultravioleta.

Na Figura 16, apresentam-se os dois critérios de maior importância para a verificação de anomalias no conjunto de calibração, os resíduos de Student e leverage. Por definição, os valores máximos permitidos para estes parâmetros são 2,5 e 1,2 (3 VL/N), respectivamente. Utilizando-se estes argumentos, observa-se que nenhuma anomalia existe no conjunto utilizado para a elaboração do modelo.

Finalmente, na Figura 17 se apresenta o gráfico que relaciona valores reais com valores previstos pelo modelo, para cada espécie estudada nos padrões de calibração. Observa-se neste gráfico, e nos valores inscritos, que existe uma coerência perfeita entre ambos valores, o que, pelo menos antecipadamente, permite prever uma boa capacidade de previsão do modelo multivariado desenvolvido. Entretanto, uma validação verdadeira deve ser feita com misturas sintéticas que não foram utilizadas na etapa de calibração. Quando esta prova é realizada (ver Tabela 9), percebe-se que a capacidade de previsão do modelo que utiliza 8 VLs é excelente, permitindo erros relativos máximos da ordem de 2,7% para os componentes em estudo.

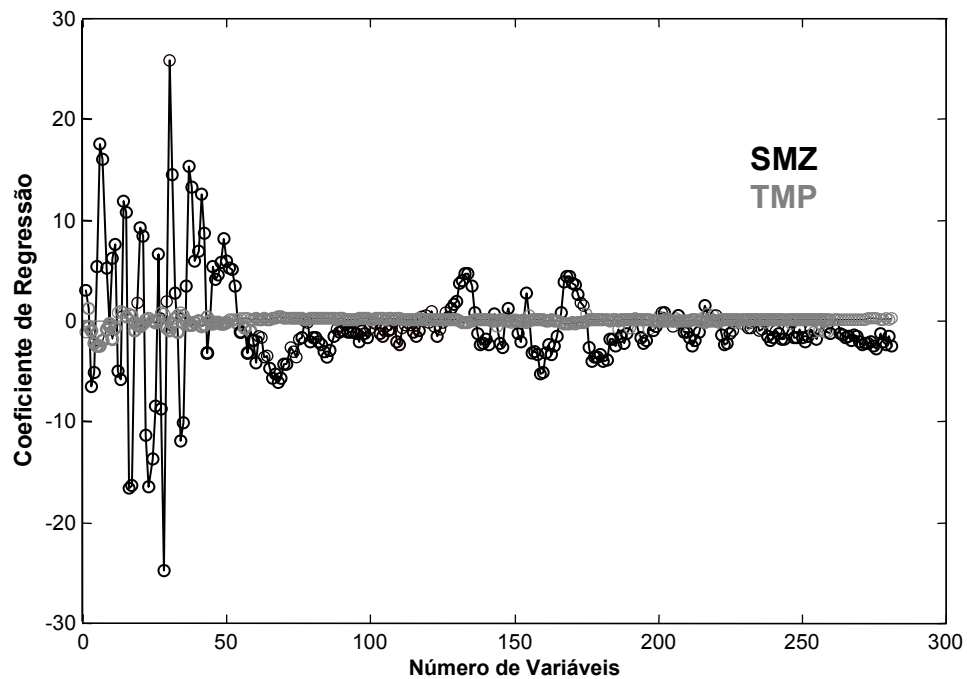


FIGURA 15. GRÁFICO DO COEFICIENTE DE REGRESSÃO *VERSUS* VARIÁVEIS ORIGINAIS PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 8 VLS.

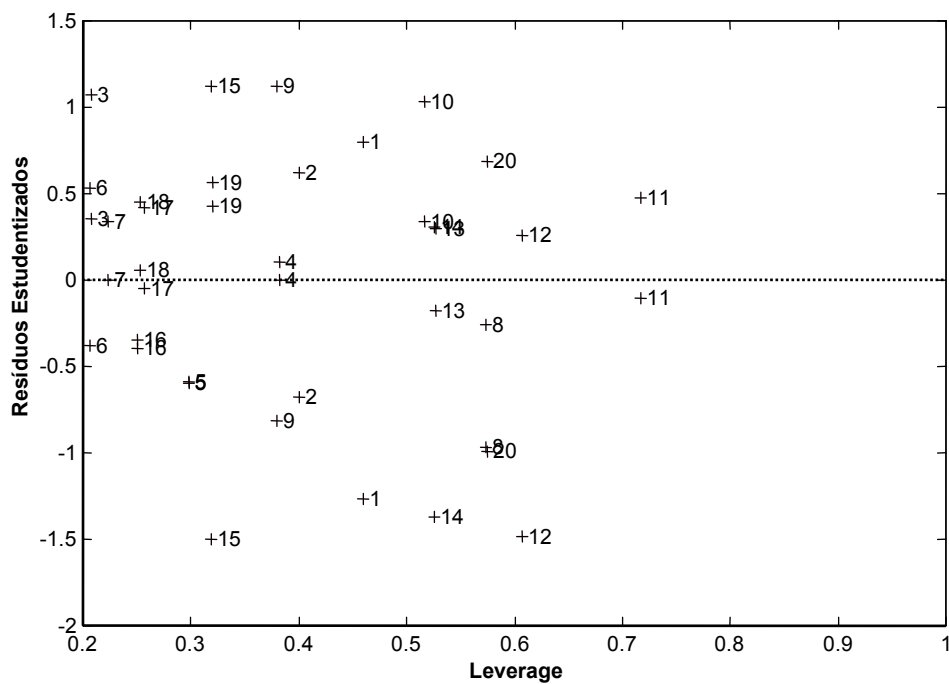


FIGURA 16. GRÁFICO DE RESÍDUOS ESTUDENTIZADOS *VERSUS* "LEVERAGE" PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 8 VLS.

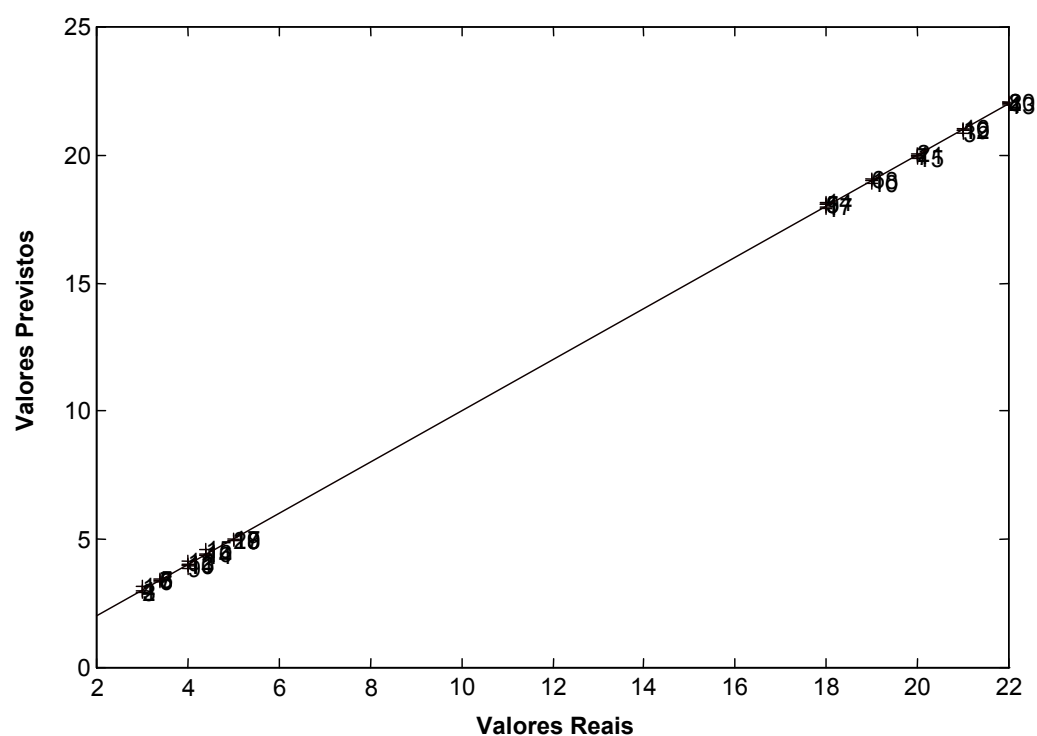


FIGURA 17. GRÁFICO DE VALORES REAIS VERSUS VALORES PREVISTOS PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 8 VLS.

TABELA 9. RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS MISTURAS SINTÉTICAS DE SMZ E TMP, RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO, UTILIZANDO MODELOS COM DIFERENTES NÚMEROS DE VARIÁVEIS LATENTES (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg L^{-1} E ERRO RELATIVO EM %).

CONCENTRAÇÃO REAL		CONCENTRAÇÃO PREVISTA															
		19 VL				8 VL				5 VL				3 VL			
SMZ	TMP	SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO	
19,0	3,0	19,2	3,1	1,05	3,3	19,2	3,0	1,0	0,0	18,9	3,0	0,5	0,0	18,6	3,2	2,1	6,7
21,0	3,4	20,6	3,5	1,90	2,9	20,6	3,5	1,9	2,9	20,1	3,5	4,3	2,9	20,3	3,5	1,5	2,9
19,0	4,4	18,8	4,5	1,05	2,3	18,9	4,4	0,5	0,0	19,4	4,6	2,1	4,5	19,0	4,6	0,0	4,5
22,0	4,4	19,8	4,6	10,0	4,5	19,9	4,7	9,5	6,8	21,0	4,6	4,5	4,5	21,0	4,6	4,5	4,5
20,0	5,0	20,1	4,7	0,5	6,0	20,1	4,8	0,5	4,0	20,0	4,8	0,0	4,0	19,6	4,8	2,0	4,0
Erro Médio				2,9	3,8			2,7	2,7			2,3	3,2			2,0	4,5

5.1.5.2. Espectrofotometria Derivativa

A espectrofotometria derivativa consiste na representação das derivadas da absorvância em relação ao comprimento de onda, em função do comprimento de onda. A diferenciação da lei Lambert-Beer permite obter equações que mostram que as derivadas $d^n A/d\lambda^n$ são sempre proporcionais às concentrações do analito, sendo as aplicações analíticas baseadas neste fato. Os métodos de derivação espectral envolvem diferenciação eletrônica ou por software e são disponíveis em muitos espectrofotômetros UV-Vis. Em geral, a derivação espectral visa determinações simultâneas, bem como aumento de seletividade. Entretanto, freqüentemente observa-se aumento de sensibilidade e melhoria do limite de detecção. O aumento de sensibilidade observado na espectrometria derivativa é baseado na observação de que a amplitude da derivada n da absorvância em relação ao comprimento de onda ($D_n = d^n A/d\lambda^n$) é inversamente proporcional à largura de banda do espectro ordinário (W), conforme expressão 14:

$$D_n \propto 1/W^n \quad (14)$$

Por esta razão, a sensibilidade em métodos derivativos depende, não somente dos parâmetros instrumentais e da forma de medida do sinal (método da tangente, pico-a-pico ou zero-a-pico), mas também das características do espectro de absorção ordinário. A ordem da derivada deve ser cuidadosamente selecionada, visto que usualmente verifica-se um aumento do nível de ruído com o aumento da ordem de derivação (ROCHA *et al.*, 2004).

No desenvolvimento deste modelo foi utilizado o mesmo conjunto de espectros, desta vez na forma da primeira derivada (Figura 18).

Novamente, o mínimo valor de PRESS é alcançado com um grande número de variáveis latentes (19). Entretanto, visando aumentar a robustez do modelo e levando em consideração a pouca significância das últimas VLs, em relação à variância representada (Figura 19), modelos mais simples foram desenvolvidos.

Desenvolvendo-se um modelo com apenas 3 VLs, verifica-se que praticamente toda a região espectral monitorada se correlaciona adequadamente com a concentração dos substratos em estudo (Figura 20).

Adicionalmente, verifica-se ausência de anomalias no conjunto de calibração (Figura 21), levando-se em consideração o critério estatístico (resíduos de Students) e geométrico (leverage).

Finalmente, o bom ajuste do modelo pode ser verificado na Figura 22, na qual se apresenta a correlação entre valores reais e previstos.

A capacidade preditiva dos modelos desenvolvidos em primeira derivada pode ser avaliada a partir dos resultados apresentados na Tabela 10. Observa-se que na análise de misturas sintéticas, o modelo permite previsões coerentes com os valores conhecidos, com erros médios da ordem de 5%. Uma vez que a derivação aumenta o sinal do ruído, um procedimento de alisamento foi posteriormente ensaiado. Este procedimento (SAVITZKY-GOLAY) não proporcionou nenhuma melhora substancial no modelo, motivo pelo quais os resultados não são apresentados.

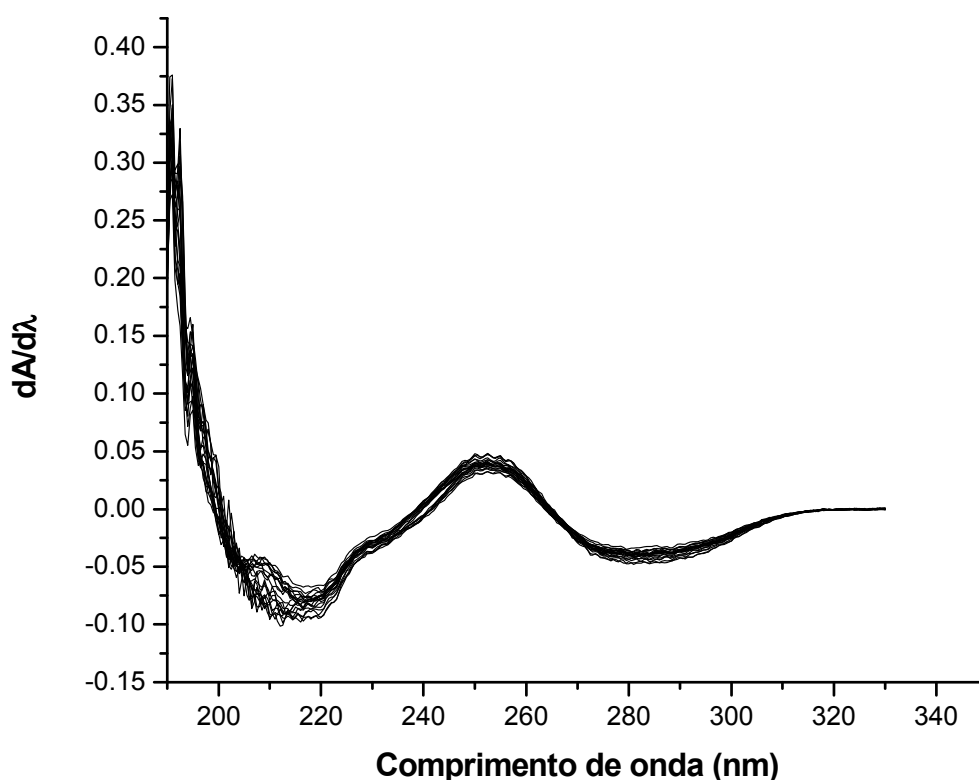


FIGURA 18. ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS DAS MISTURAS DE SMZ E TMP, EM PRIMEIRA DERIVADA, UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO MUTIVARIADO.

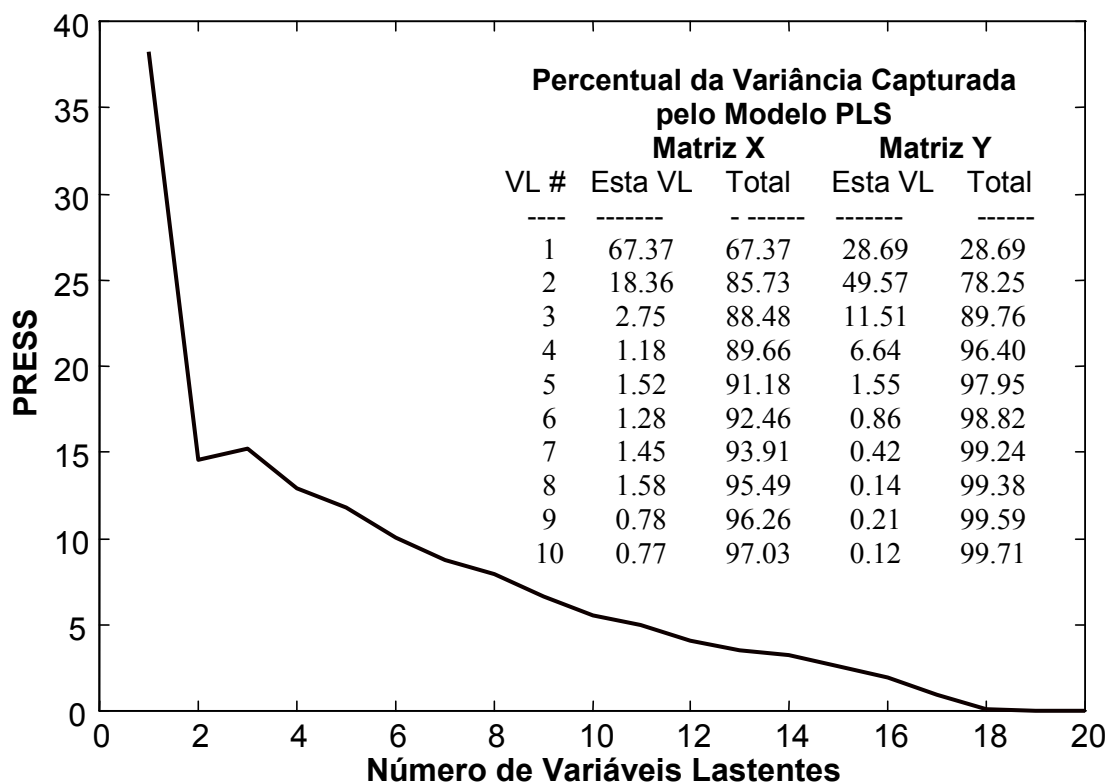


FIGURA 19. GRÁFICO DO SOMATÓRIO DOS ERROS DE PREVISÃO (PRESS) VERSUS NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES.

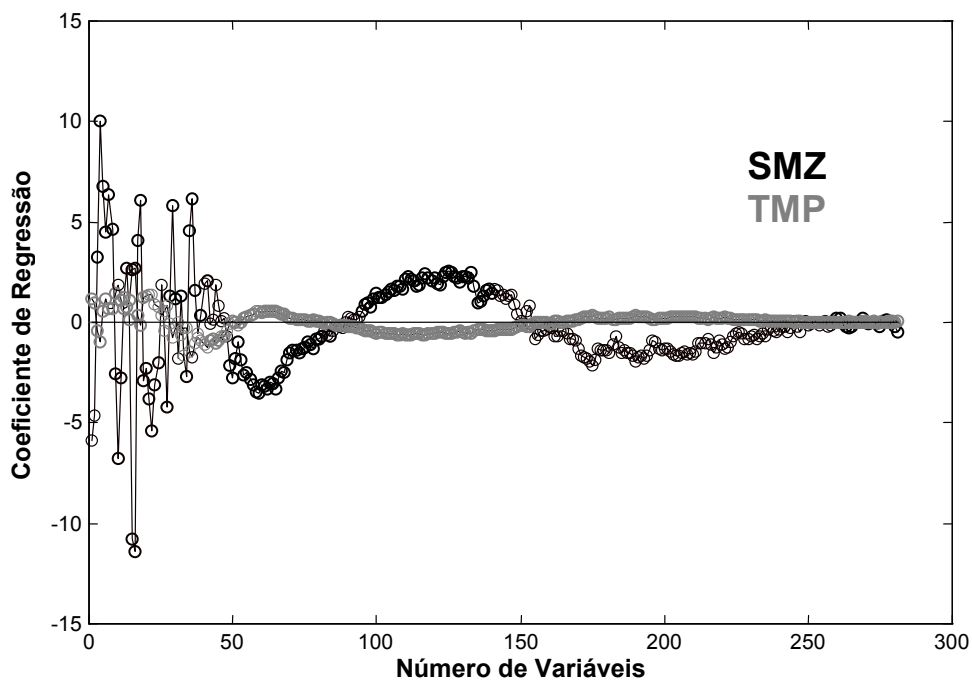


FIGURA 20. GRÁFICO DO COEFICIENTE DE REGRESSÃO VERSUS VARIÁVEIS ORIGINAIS, PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 3 VLS.

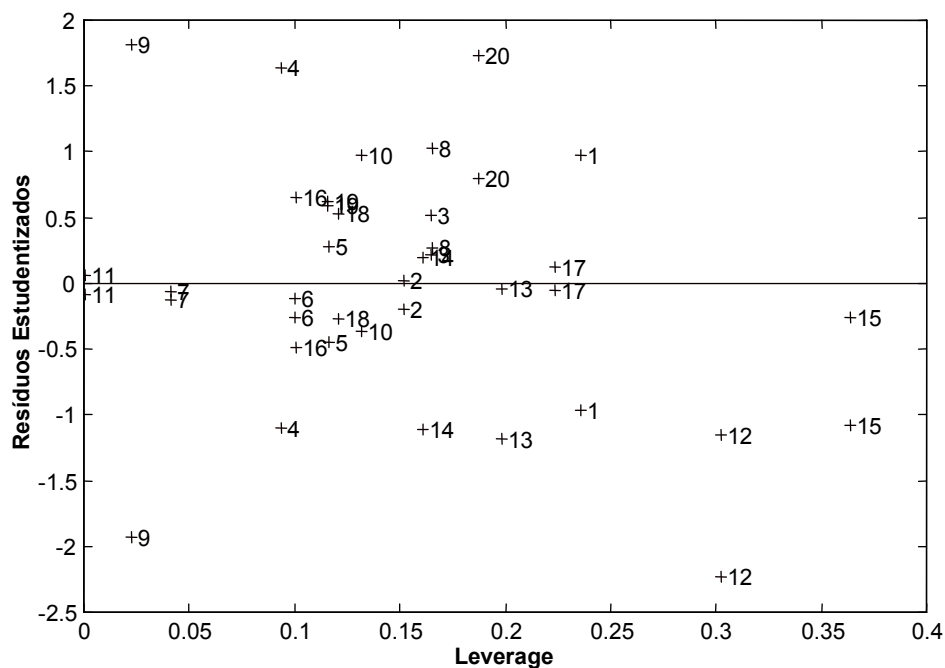


FIGURA 21. GRÁFICO DE RESÍDUOS ESTUDENTIZADOS *VERSUS* "LEVERAGE" PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 3 VLS.

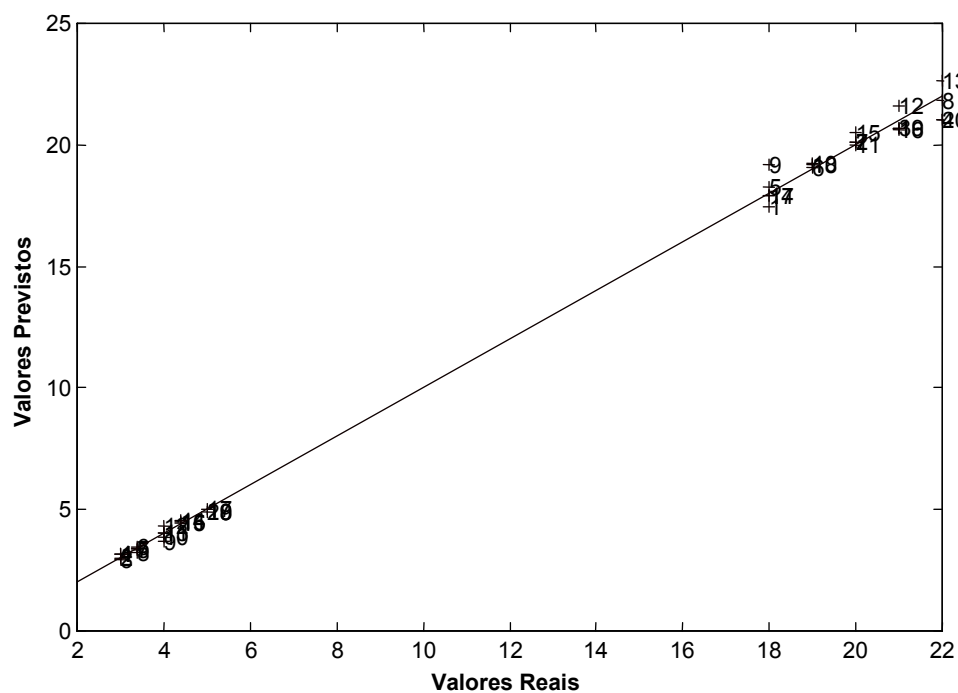


FIGURA 22. GRÁFICO DE VALORES REAIS *VERSUS* VALORES PREVISTOS, PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 3 VLS.

TABELA 10. RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS MISTURAS SINTÉTICAS DE SMZ E TMP, RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO, UTILIZANDO MODELOS COM DIFERENTES NÚMEROS DE VARIÁVEIS LATENTES E ESPECTROS EM PRIMEIRA DERIVADA (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg L⁻¹ E ERRO RELATIVO EM %).

CONCENTRAÇÃO REAL		CONCENTRAÇÃO PREVISTA															
		19 VL				8 VL				5 VL				3 VL			
SMZ	TMP	SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO	
19,0	3,0	18,5	3,3	2,6	10,0	18,5	3,2	2,5	6,7	18,8	3,1	1,0	3,3	18,7	3,1	1,6	3,3
21,0	3,4	21,0	3,4	0,0	0,0	21,0	3,4	0,0	0,0	21,0	3,4	0,0	0,0	21,0	3,4	0,0	0,0
19,0	4,4	18,5	4,7	2,6	6,8	18,6	4,8	2,1	9,0	18,3	4,8	3,7	9,0	17,9	4,8	5,8	9,0
22,0	4,4	18,9	4,7	14,1	6,8	19,1	4,9	13,2	11,3	19,1	4,9	13,2	11,3	19,5	4,9	11,4	11,3
20,0	5,0	19,6	4,8	10,9	4,0	19,4	4,7	3,0	6,0	19,4	4,9	3,0	2,0	19,8	4,8	1,0	4,0
Valor médio				6,05	5,5			4,2	6,6			4,2	5,1			4,0	5,5

5.1.5.3. Espectrofotometria com autoescalamento

Em função das amostras reais conterem os substratos em estudo em concentrações significativamente diferentes, os sinais espectroscópicos registrados também diferem significativamente. Para contornar os inconvenientes derivados destas diferenças, os espectros foram autoescalados, utilizando-se uma rotina do Software Matlab 4.2. Este procedimento consiste, simplesmente, em diminuir cada valor de absorvância pelo valor médio e posteriormente dividir pelo desvio padrão.

Os resultados, apresentados na Tabela 11, indicam que este tipo de pré-tratamento não induz significativas melhoras na capacidade de previsão do modelo, uma vez que resultados muito similares ao modelo anterior foram observados.

TABELA 11. RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS MISTURAS SINTÉTICAS DE SMZ E TMP, RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO, UTILIZANDO MODELOS COM DIFERENTES NÚMEROS DE VARIÁVEIS LATENTES E ESPECTROS AUTOESCALADOS (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg L⁻¹ E ERRO RELATIVO EM %).

CONCENTRAÇÃO REAL		NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES											
		19 VL			8 VL			5 VL			3 VL		
SMZ	TMP	SMZ	TMP	ERRO	SMZ	TMP	ERRO	SMZ	TMP	ERRO	SMZ	TMP	ERRO
19,0	3,0	18,8	3,2	1,0 6,6	18,9	3,0	0,5 0,0	18,9	3,1	0,5 3,3	17,9	3,2	5,8 6,7
21,0	3,4	20,7	3,4	1,4 0,0	20,5	3,5	2,4 2,9	20,4	3,5	2,9 2,9	20,8	3,5	0,9 2,9
19,0	4,4	17,2	4,9	9,5 11,4	17,3	4,8	8,9 9,0	17,7	4,7	6,8 6,8	18,4	4,6	3,2 4,5
22,0	4,4	20,4	4,7	7,3 6,8	20,4	4,8	7,3 9,0	20,6	4,6	6,4 4,5	20,9	4,6	5,0 4,5
20,0	5,0	20,5	4,7	2,5 2,5	20,7	4,7	3,5 6,0	20,5	4,8	2,5 4,0	19,5	4,8	2,5 4,0
Valor médio		4,3	5,5			4,5	5,4			3,8	4,3		3,5 4,5

5.1.6. Análise de amostras reais (medicamentos)

Uma rápida avaliação dos resultados, resumidamente apresentados na Figura 23, permite verificar que os melhores modelos de calibração estão representados por aqueles que envolvem espectros sem nenhum tipo de pré-tratamento e 8 variáveis latentes. Este modelo foi utilizado para previsão de amostras de medicamentos, cujos resultados são apresentados na Tabela 12. Como referência, utilizaram-se os valores declarados na bula do medicamento e os resultados da análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

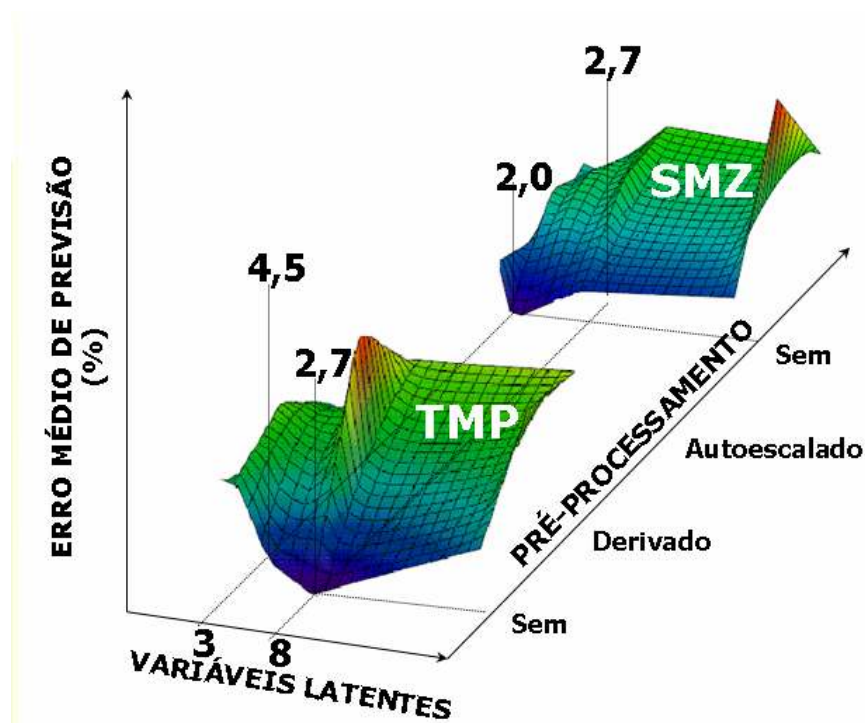


FIGURA 23. REPRESENTAÇÃO DO ERRO MÉDIO DA PREVISÃO DE SMZ E TMP, EM FUNÇÃO DO PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES.

TABELA 12. RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES OBTIDAS NA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS UTILIZANDO-SE O MELHOR MODELO MULTIVARIADO.

Amostras	Concentração Real (mg g ⁻¹) ^I		Concentração Prevista (mg g ⁻¹) ^{II}		Concentração por CLAE (mg g ⁻¹) ^{III}		Erro (%) ^{IV}	
	SMZ	TMP	SMZ	TMP	SMZ	TMP	SMZ	TMP
Qiftrim	594,9	119,0	468,4 +/- 41,2	122,0 +/- 3,9	622,6 +/- 2,4	162,0 +/- 0,1	-24,7	-24,7
Bac Sulftrin	641,1	128,2	596,8 +/- 13,6	95,3 +/- 3,6	593,2 +/- 1,9	114,4 +/- 1,0	+0,6	-16,7
Infectrin	789,1	157,0	438,2 +/- 84,9	188,9 +/- 2,6	717,9 +/- 1,0	129,4 +/- 0,05	-39,0	+51,2
Fio Cruz	626,4	125,3	371,0 +/- 51,4	139,8 +/- 8,3	575,9 +/- 3,1	105,2 +/- 0,7	-35,6	+32,9
Bactrim	789,1	157,8	777,4 +/- 19,5	156,5 +/- 4,0	839,4 +/- 0,5	151,3 +/- 0,3	-7,4	+3,4

LEGENDA:

I: Concentração calculada a partir da composição informada na bula do medicamento, considerando-se a massa média dos 10 comprimidos.

II: Concentração prevista pelo modelo multivariado em análise em triplicata (precisão expressa na forma de estimativa do desvio padrão).

III: Concentração determinada por CLAE em análise em duplicata (precisão expressa na forma de estimativa do desvio padrão).

IV: Erro relativo em relação ao valor determinado por técnica cromatográfica padrão .

Antes de se analisar estes resultados, é pertinente salientar que as informações contidas na bula são expressas na forma de miligramas de princípio ativo por comprimido. Tal como pode ser observado na Figura 24 e Tabela 13, a massa dos comprimidos é bastante heterogênea, o que implica discrepâncias da concentração quando as análises envolvem dissolução do comprimido. Admitindo-se uma composição homogênea dos comprimidos, as diferenças de massa podem acarretar diferenças de concentração da ordem de 2%, em relação ao valor médio.

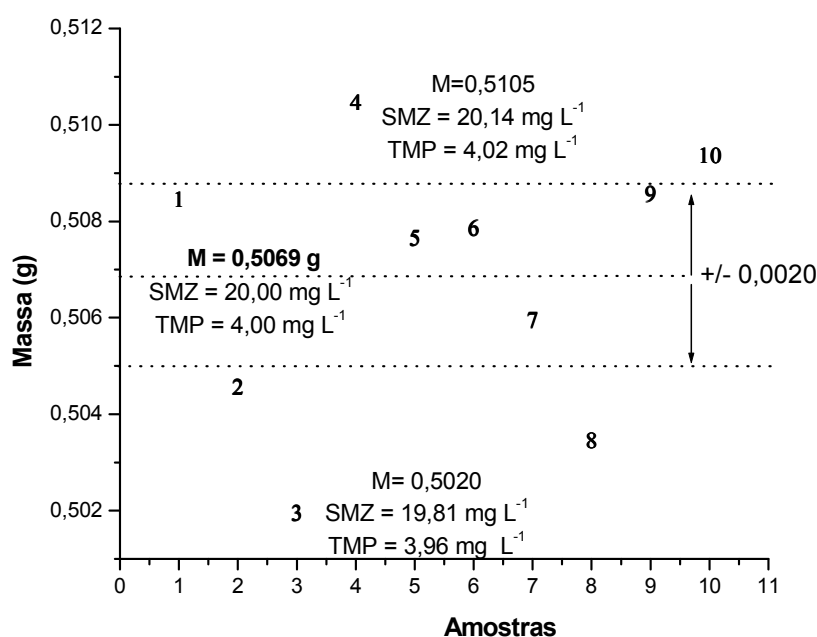


FIGURA 24. FLUTUAÇÃO DA MASSA DOS COMPRIMIDOS DO MEDICAMENTO DE REFERÊNCIA (BACTRIM) E A SUA INFLUÊNCIA NA CONCENTRAÇÃO DOS FÁRMACOS EM SOLUÇÃO.

TABELA 13. FLUTUAÇÃO DA MASSA DOS COMPRIMIDOS DOS MEDICAMENTOS ANALISADOS E A SUA INFLUÊNCIA NA CONCENTRAÇÃO DOS FÁRMACOS EM SOLUÇÃO.

AMOSTRA	Massa média (g)	Intervalo de confiança [ts(n) ^{1/2}]	Desvio na concentração em solução (%)
Qiftrim	0,6724	0,0028	0,42
Bacsulftrin	0,6239	0,0094	1,51
Infectrin	0,5069	0,0121	2,39
FioCruz	0,6386	0,0051	0,80
Bactrim	0,5069	0,0020	0,39

Os resultados mostram, em primeiro lugar, que o modelo permite uma excelente previsão do medicamento de referência (Bactrim), com erros inferiores a 7% em relação aos valores determinados pela técnica cromatográfica padrão. Adicionalmente, observa-se uma elevada reprodutibilidade nos valores da triplicata, para ambas as metodologias empregadas, assim como uma boa coerência com os valores declarados na bula do medicamento. Para os medicamentos restantes o modelo multivariado fornece resultados bastante discrepantes, principalmente em razão das significativas diferenças observadas nos respectivos espectros. A partir dos espectros apresentados na Figura 25, é possível observar uma grande semelhança entre o medicamento de referência (Bactrim) e a mistura padrão que contém os princípios em iguais concentrações que as do medicamento. Para os medicamentos restantes, observa-se um deslocamento da banda centrada em 268 nm, além de uma significativa diminuição de sinal. Trata-se de uma situação anômala, a qual, em princípio, pode ser atribuída à presença de excipientes.

Estudos posteriores, permitiram verificar discretas diferenças de pH nas amostras solubilizadas dos medicamentos, assim como substanciais modificações do perfil espectroscópico de ambas espécies, quando em diferentes condições de acidez (Figuras 26A e 27A). Analisando-se a estrutura química dos compostos em estudo, evidenciam-se centros de maior densidade eletrônica (Figuras 26B e 27B), passíveis de protonação. Embora a diferença nos valores de pH nos diversos medicamentos seja discreta, os deslocamentos provocados pela protonação podem ser relevantes (Figura 28), o que compromete a capacidade de previsão dos modelos desenvolvidos.

Diante de tal inconveniente, duas alternativas de minimização podem ser praticadas. A primeira envolve o uso de sistemas tamponados, enquanto que a segunda envolve o desenvolvimento de modelos que incluam os excipientes causadores de referida anomalia.

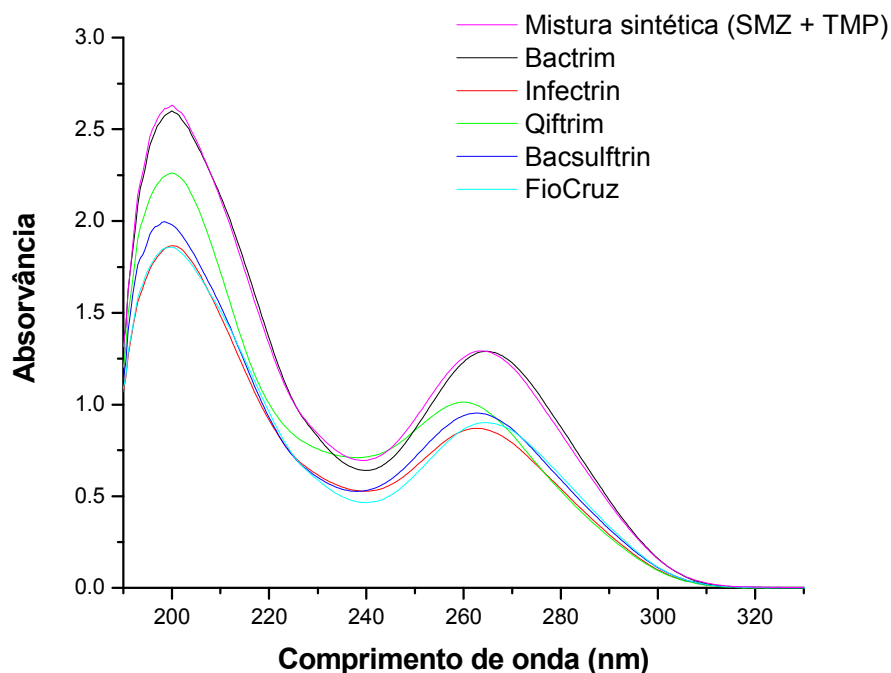


FIGURA 25. ESPECTROS UV-VIS DE UMA MISTURA SINTÉTICA UTILIZADA NA CALIBRAÇÃO E OS MEDICAMENTOS ANALISADOS.

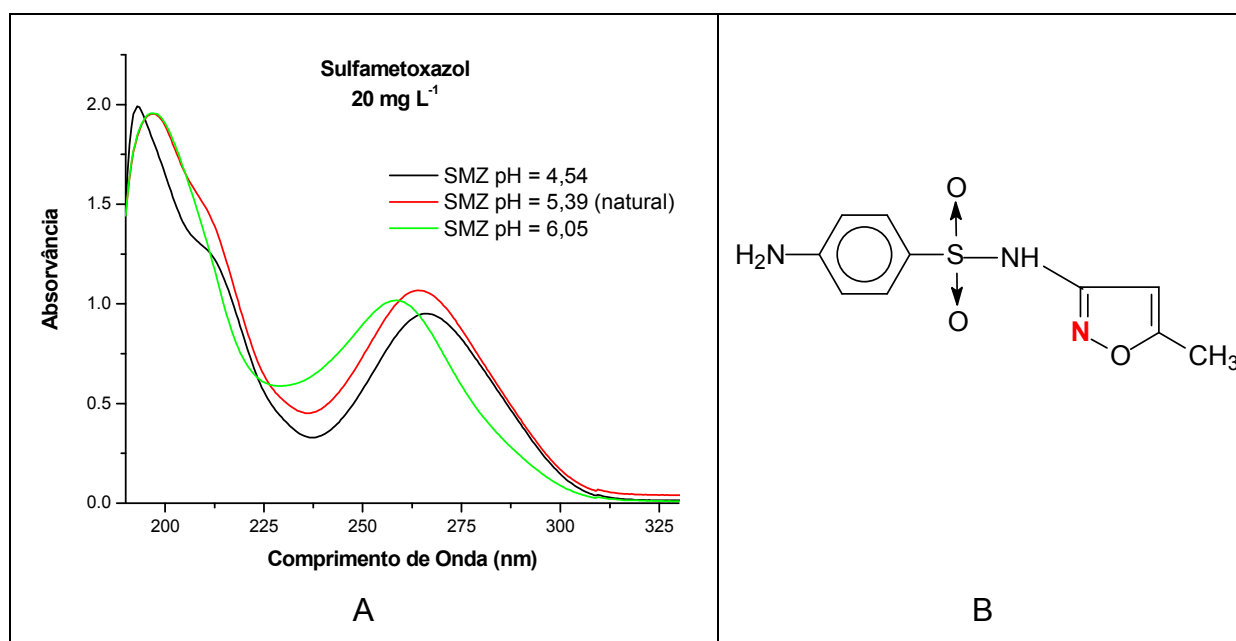


FIGURA 26. ESPECTROS UV-VIS DE SOLUÇÕES DE SULFAMETOXAZOL (A), UTILIZADAS NO ESTUDO DO EFEITO DA VARIAÇÃO DO pH. ESTRUTURA QUÍMICA DO SMZ, COM DESTAQUE PARA O ÁTOMO SUSCEPTÍVEL A PROTONAÇÃO (B).

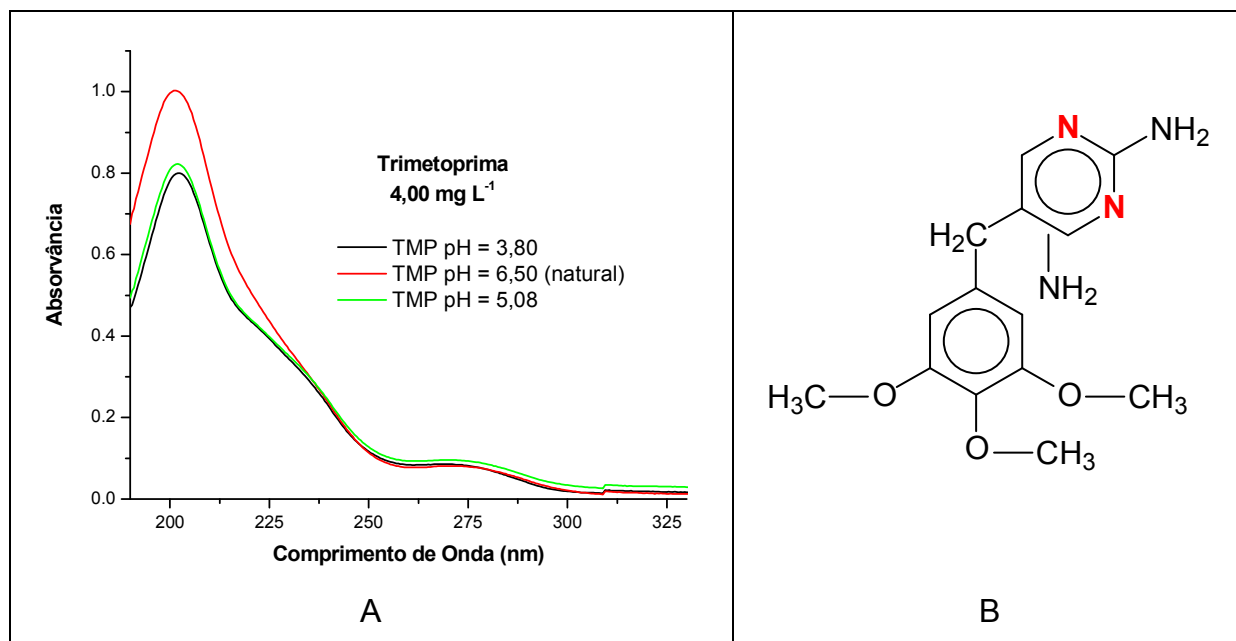


FIGURA 27. ESPECTROS UV-VIS DE SOLUÇÕES DE TRIMETOPRIM (A), UTILIZADAS NO ESTUDO DO EFEITO DA VARIAÇÃO DO pH. ESTRUTURA QUÍMICA DO TMP, COM DESTAQUE PARA OS ÁTOMOS SUSCEPTÍVEIS A PROTONAÇÃO (B).

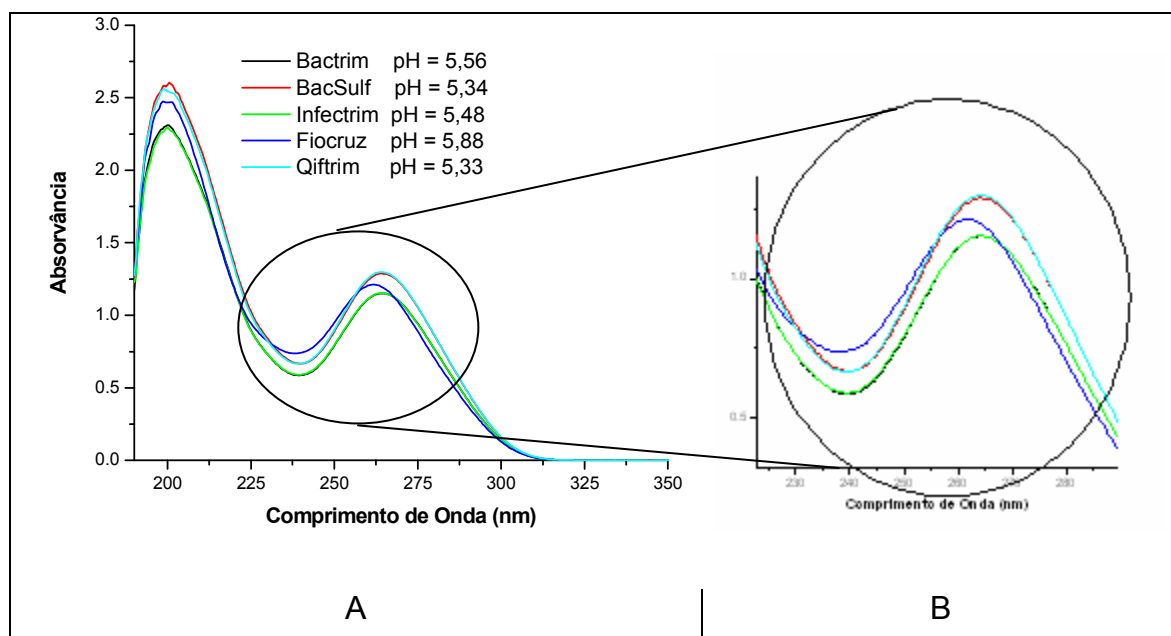


FIGURA 28. ESPECTROS UV-VIS DOS MEDICAMENTOS ANALISADOS E OS RESPECTIVOS VALORES DE pH (A). AMPLIAÇÃO DA REGIÃO COM MAIOR DESLOCAMENTO DA BANDA DE ABSORÇÃO (B).

5.1.7. Estudos de validação

Visando avaliar as figuras de mérito do modelo multivariado, estudos de validação foram realizados de acordo com critérios estabelecidos pela ANVISA. De acordo com estas especificações, parâmetros como repetibilidade, reprodutibilidade e robustez, frente a mudanças de pH, temperatura e tempo de leitura, foram avaliados. Para realização deste estudo, o melhor modelo multivariado foi selecionado, o qual foi desenvolvido com 8 VL's e a partir de espectros sem pré-tratamento.

5.1.7.1. Precisão

As análises de precisão envolveram estudos de repetibilidade (precisão intra-corrida) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial).

5.1.7.1.1. Repetibilidade

O teste de repetibilidade avalia a diferença entre repetições do mesmo ensaio, executado no mesmo laboratório e pelo mesmo analista. Isto é, nas mesmas condições de amostra, equipamento e analista.

Para avaliação deste parâmetro três misturas sintéticas, contendo concentrações baixa (18,0 mg L⁻¹ de SMZ e 3,0 mg L⁻¹ de TMP), média (20,0 mg L⁻¹ de SMZ e 4,0 mg L⁻¹ de TMP) e alta (22,0 mg L⁻¹ de SMZ e 5,0 mg L⁻¹ de TMP), foram analisadas em triplicata.

Os resultados apresentados na Tabela 14 demonstram uma excelente capacidade de recuperação dos modelos propostos, com valores entre 99% e 101%, assim como desvios padrão relativos (DPR) inferiores a 5%, portanto dentro dos valores aceitos pela legislação vigente (ANVISA, 2003).

5.1.7.1.2. Reprodutibilidade

O teste de reprodutibilidade é semelhante ao de repetibilidade, com a diferença que, neste caso, a análise é realizada por outro analista, em outro laboratório, e com outro equipamento.

Os resultados obtidos neste ensaio são apresentados na Tabela 15, demonstrando a obtenção de desvios padrão relativos (DPR) dentro dos limites impostos pela norma específica (<5%).

TABELA 14. RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIM NO ENSAIO DE REPETIBILIDADE.

Amostra	Sulfametoxazol		Trimetoprim	
	Real	Previsto	Real	Previsto
Mistura 1	18,00	18,40	3,00	3,01
Mistura 1d	18,00	17,98	3,00	2,86
Mistura 1t	18,00	17,75	3,00	3,14
Media		18,04	Media	3,00
DPR		1,83	DPR	4,67
Recuperação (%)		100,22	Recuperação (%)	100,00
Amostra	Sulfametoxazol		Trimetoprim	
	Real	Previsto	Real	Previsto
Mistura 2	20,00	20,50	4,00	4,09
Mistura 2d	20,00	19,72	4,00	4,00
Mistura 2t	20,00	20,36	4,00	3,98
Media		20,19	Media	4,02
DPR		2,06	DPR	1,46
Recuperação (%)		100,95	Recuperação (%)	100,50
Amostra	Sulfametoxazol		Trimetoprim	
	Real	Previsto	Real	Previsto
Mistura 3	22,00	21,02	5,00	4,75
Mistura 3d	22,00	21,80	5,00	5,21
Mistura 3t	22,00	22,77	5,00	4,99
Media		21,86	Media	4,98
DPR		4,01	DPR	4,61
Recuperação (%)		99,36	Recuperação (%)	99,60

TABELA 15. RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIM NO ENSAIO DE REPRODUTIBILIDADE.

Amostra 1	Sulfametoxazol (18,00 mg L⁻¹)	Trimetoprim (3,00 mg L⁻¹)
Determinações do analista 1	18,40 17,98 17,75	3,01 2,86 3,14
Determinações do analista 2	18,12 17,87 18,05	2,99 3,04 2,94
Média (mg L⁻¹)	18,03	2,99
Desvio Padrão Relativo (%)	1,24	3,16
Amostra 2	Sulfametoxazol (20,00 mg L⁻¹)	Trimetoprim (4,00 mg L⁻¹)
Determinações do analista 1	20,50 19,72 20,36	4,09 4,00 3,98
Determinações do analista 2	19,98 19,17 20,47	3,99 4,00 3,97
Média (mg L⁻¹)	20,03	4,01
Desvio Padrão Relativo (%)	2,61	1,08
Amostra 3	Sulfametoxazol (22,00 mg L⁻¹)	Trimetoprim (5,00 mg L⁻¹)
Determinações do analista 1	21,02 21,80 22,77	4,75 5,21 4,99
Determinações do analista 2	22,53 20,83 20,71	4,93 4,77 5,15
Média (mg L⁻¹)	21,61	4,97
Desvio Padrão Relativo (%)	4,14	3,82

5.1.7.2. Robustez

A sensibilidade do método multivariado frente a variações externas, nas condições experimentais ou nas amostras, constitui um fator tão importante quanto às avaliações dos erros de previsão (SWIERENGA *et al.*, 1999). A análise da robustez determina as condições próprias em que deve ser desenvolvida a calibração e os fatores que devem ser levados em conta durante a construção do modelo. Considerando que a etapa fundamental do modelamento constitui a obtenção dos espectros das espécies de interesse, a principal observação a ser feita é que quaisquer alterações das condições experimentais ou ambientais podem refletir na resposta espectral, isto pode alterar os resultados da calibração e conseqüentemente os resultados de previsão, podendo gerar erros significativos de determinação. Neste trabalho, os parâmetros de robustez do método multivariado avaliados foram a influência da temperatura, do tempo de leitura e do pH.

5.1.7.2.1. Influência da temperatura

O efeito da temperatura foi avaliado entre 5 e 50 °C, utilizando-se a mistura que melhor representa a composição dos medicamentos em estudo (SMZ: 20,00 mg L⁻¹, TMP: 4,0 mg L⁻¹). Os espectros, apresentados na Figura 29, demonstram um efeito significativo da temperatura no perfil de absorção, o que se manifesta como mudanças na intensidade dos sinais registrados e deslocamento na região próxima de 260 nm.

Submetendo-se os espectros ao modelo multivariado, obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 16, os quais confirmam o indesejado efeito da temperatura, quando os valores praticados se afastam do valor em que o modelo foi desenvolvido (25°C).

O fato das amostras terem sido solubilizadas em soluções aquosas de etanol, sugere que o efeito da temperatura pode ser uma função de perdas diferenciadas de solvente, durante o processo de leitura.

Em razão deste comportamento, a necessidade de se desenvolver modelos em condições que possam ser reproduzidas durante a análise é bastante evidente. Caso aconteçam significativas variações de temperatura, o modelo deverá ser atualizado sob essas novas condições.

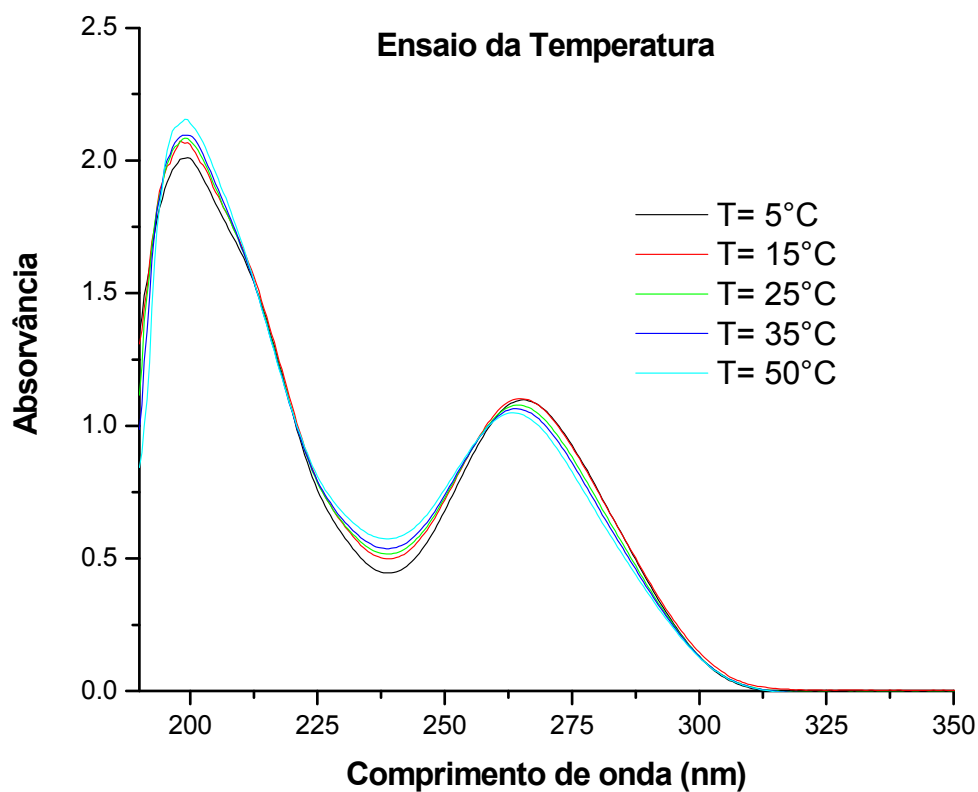


FIGURA 29. EFEITO DA TEMPERATURA NOS ESPECTROS UV-VIS DAS MISTURAS DE SULFAMETOXAZOL (20,00 mg L⁻¹) E TRIMETOPRIM (4,00 mg L⁻¹).

TABELA 16. RESULTADOS OBTIDOS NA PREVISÃO DA MISTURA SMZ + TMP, EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

T (°C)	Real		Previsto		Erro (%)	
	SMZ	TMP	SMZ	TMP	SMZ	TMP
05	20,00	4,00	19,10	2,55	-4,49	-36,19
15	20,00	4,00	16,29	3,31	-18,53	-17,19
25	20,00	4,00	19,37	3,85	-3,14	-3,85
35	20,00	4,00	16,26	5,09	-18,70	27,31
50	20,00	4,00	9,81	7,98	-50,97	99,56

5.1.7.2.2. Influência do tempo de leitura

A estabilidade da absorção das misturas contendo SMZ e TMP foi avaliada em função do tempo, utilizando-se como referência as misturas contendo concentrações baixas ($18,00 \text{ mg L}^{-1}$ de SMZ e $3,00 \text{ mg L}^{-1}$ de TMP), médias ($20,00 \text{ mg L}^{-1}$ de SMZ e $4,00 \text{ mg L}^{-1}$ de TMP) e altas ($22,00 \text{ mg L}^{-1}$ de SMZ e $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ de TMP).

Os espectros foram registrados imediatamente após preparo (tempo 0) e após 2, 24 e 48 h de estocagem. Neste estudo, pequenas modificações no sinal espectral foram observadas, principalmente na região centrada em 205 nm (Figura 30). Obviamente, estas diferenças provocam inconsistências nos valores previstos pelo modelo multivariado (Tabela 17), principalmente para as soluções que permaneceram estocadas por maior tempo.

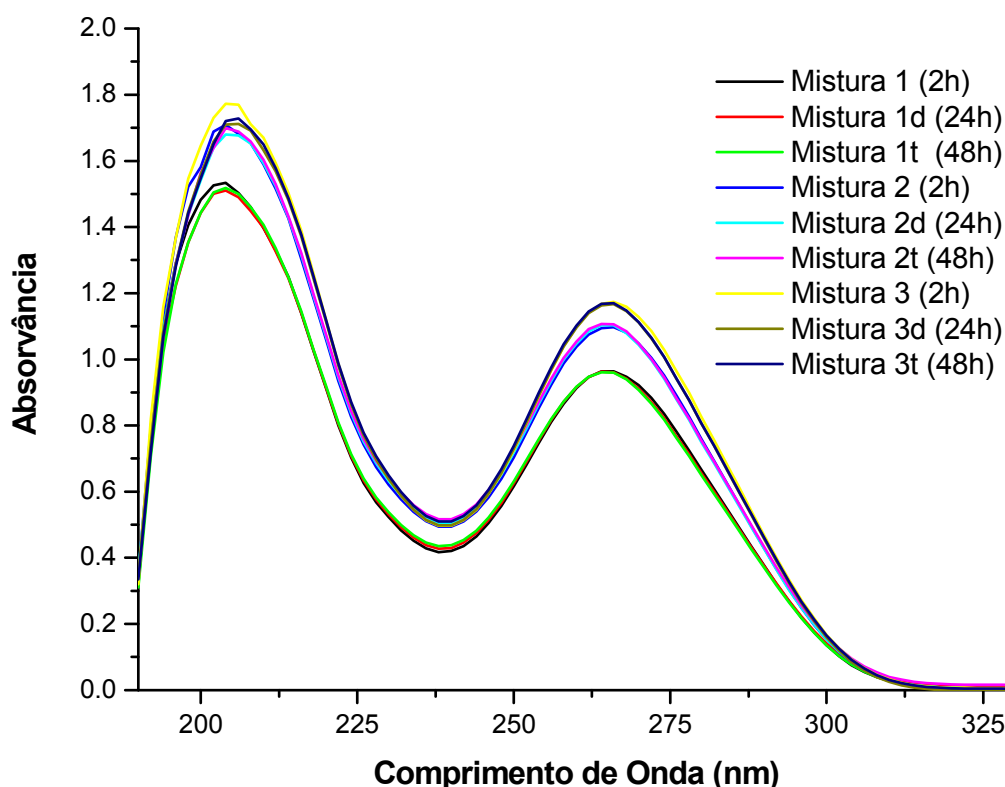


FIGURA 30. ESPECTROS OBTIDOS PARA AS SOLUÇÕES DE SMZ + TMP EM DIFERENTES TEMPOS DE LEITURA.

TABELA 17. RESULTADOS OBTIDOS NA PREVISÃO DAS SOLUÇÕES DE SMZ E TMP EM DIFERENTES TEMPOS DE LEITURA.

Amostras	Real		Previsto		Erro (%)	
	SMZ	TMP	SMZ	TMP	SMZ	TMP
Mistura 1 (2h)	18,00	3,00	18,2199	3,1035	1,22	3,45
Mistura 1 (24h)	18,00	3,00	17,9948	2,8965	-0,03	-3,45
Mistura 1 (48h)	18,00	3,00	16,9894	2,3487	-5,61	-21,71
Mistura 2 (2h)	20,00	4,00	19,3622	4,0831	-3,19	2,08
Mistura 2 (24h)	20,00	4,00	18,6463	3,9122	-6,77	-2,20
Mistura 2 (48h)	20,00	4,00	16,3826	3,7743	-18,09	-5,64
Mistura 3 (2h)	22,00	3,00	21,9659	2,9646	-0,15	-1,18
Mistura 3 (24h)	22,00	3,00	21,2508	3,3187	-3,41	10,62
Mistura 3 (48h)	22,00	3,00	20,3436	2,5459	-7,53	-15,14

5.1.7.2.3. Influência do pH

Como comentado anteriormente, mudanças de pH exercem uma significativa influência no perfil espectroscópico das amostras, principalmente em razão dos possíveis equilíbrios de protonação. Observa-se, inclusive, que moderadas diferenças de pH provocam significativa mudança no padrão de absorção (Figura 31), o que, por definição, compromete de maneira notória a capacidade de previsão dos modelos multivariados (Tabela 18).

Uma vez que os modelos foram desenvolvidos no pH natural das misturas utilizadas como padrão ($\text{pH} \cong 5,5$), a capacidade de previsão se mostra adequada apenas em valores próximos deste pH. Em valores diferentes de pH, a previsão leva a resultados que não atendem à legislação vigente, que permite erros não superiores a 5%.

Ante tal situação, o desenvolvimento de modelos em meio tamponado se apresenta essencial.

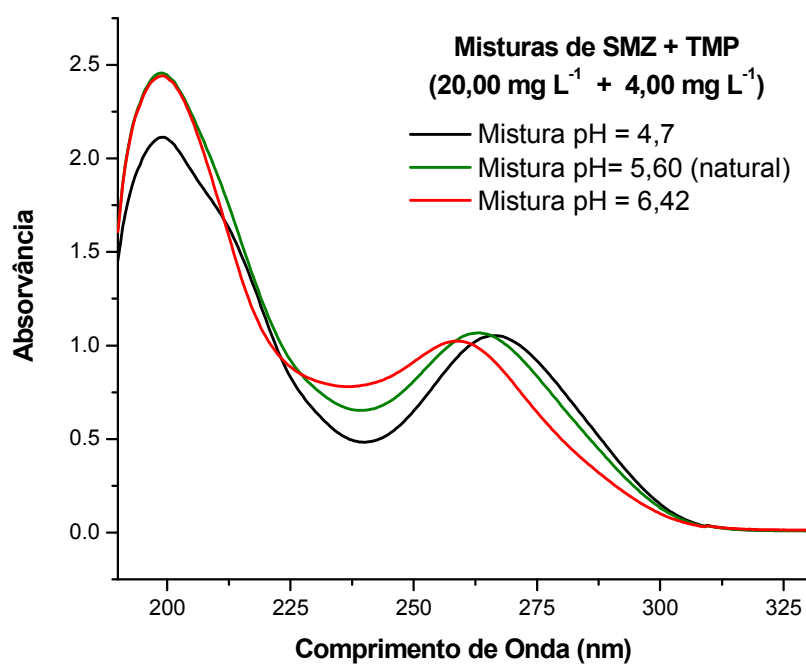


FIGURA 31. ESPECTROS DA MISTURA DE SMZ+ TMP, EM DIFERENTES VALORES DE pH.

TABELA 18. RESULTADOS OBTIDOS NA PREVISÃO DA MISTURA SMZ + TMP, EM DIFERENTES VALORES DE pH.

pH	Real		Previsto		Erro (%)	
	SMZ	TMP	SMZ	TMP	SMZ	TMP
4,67	20,00	4,00	17,77	5,59	- 11,15	+ 39,75
5,60	20,00	4,00	20,25	4,20	+ 1,25	+ 5,00
6,42	20,00	4,00	24,62	5,04	+ 23,10	+ 26,00

5.2. ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA

Os espectros infravermelho de sulfametoxazol, trimetoprim e uma amostra de medicamento contendo a mistura são apresentados na Figura 32. Em função de existirem semelhanças estruturais entre as duas substâncias, existem várias regiões em que as atribuições de bandas são análogas. Na região do infravermelho próximo (NIR) a atribuição de bandas se dá pelos sobretons das vibrações fundamentais, dentre as que destacam os estiramentos de grupos C-O, N-H e O-H.

A complexidade destes espectros dificulta a visualização de regiões espectrais que possam ser utilizadas na elaboração de modelos univariados de calibração. Trata-se de uma importante constatação, a qual justifica o desenvolvimento de modelos multivariados.

Nesta etapa, três modelos multivariados foram elaborados. Um envolvendo toda a faixa espectral monitorada (7001 a 399 cm^{-1}), um segundo envolvendo apenas a região do infravermelho médio (4000 a 399 cm^{-1}) e o último utilizando somente a região do infravermelho próximo (7001 a 4000 cm^{-1}).

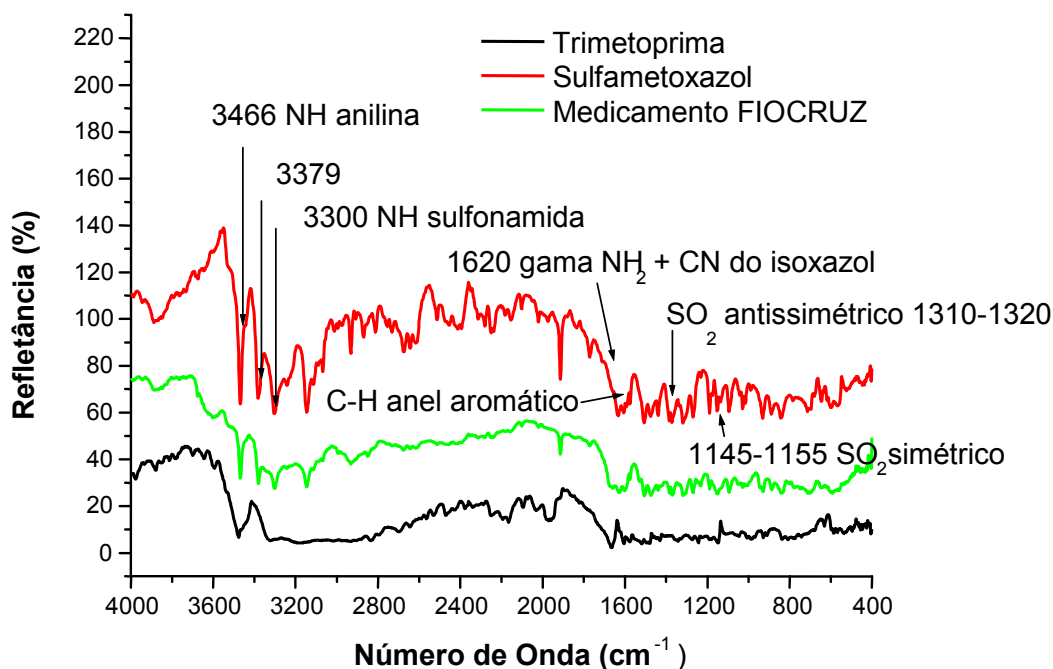


FIGURA 32. ESPECTROS DRIFT DAS ESPÉCIES EM ESTUDO, COM ATRIBUIÇÃO DAS BANDAS DE ESTIRAMENTO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO.

5.2.1. Construção de Modelos Multivariados com Espectros Originais

O primeiro estudo foi desenvolvido com os espectros integrais (7001 a 399 cm^{-1}), sem nenhum tipo de pré-processamento (Figura 33), encontrando-se resultados muito similares aos análogos obtidos por espectroscopia UV-Vis. Isto é, o mínimo PRESS é conseguido com um elevado número de VLs (19) (Figura 34), entretanto, somente as primeiras 10 apresentam relevância em termos de variância representada. Por este motivo, foram desenvolvidos 4 modelos, utilizando-se 19, 8, 5 e 3 VL's.

Avaliando-se a capacidade de previsão dos diversos modelos desenvolvidos, em relação as 5 misturas sintéticas reservadas para validação, obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 19. Observa-se que os menores erros de previsão estão associados ao uso de 8 VL's, com erros de previsão que não ultrapassam 5% .

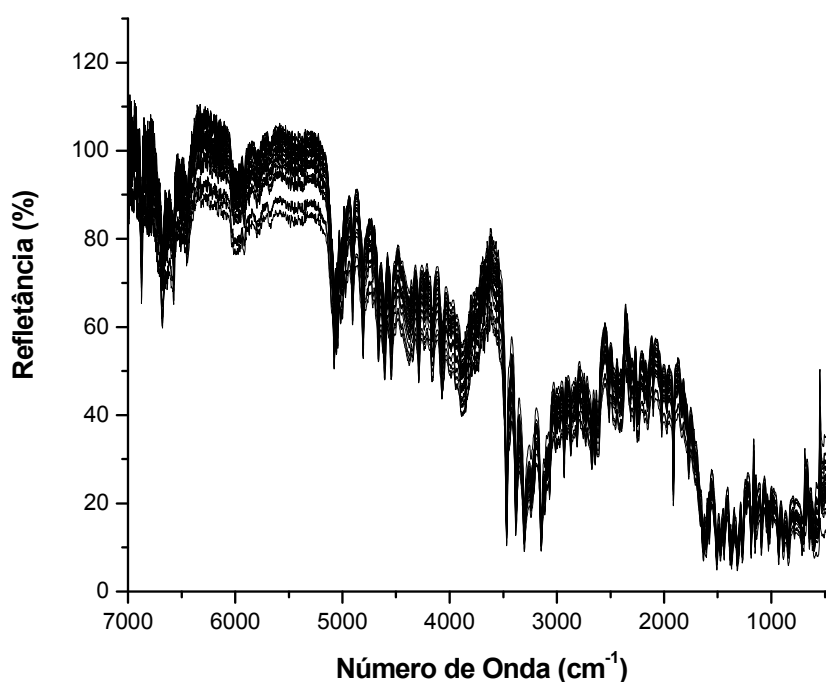


FIGURA 33. ESPECTROS INFRAVERMELHOS (DRIFT) DAS MISTURAS DE SMZ E TMP UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO MUTIVARIADO.

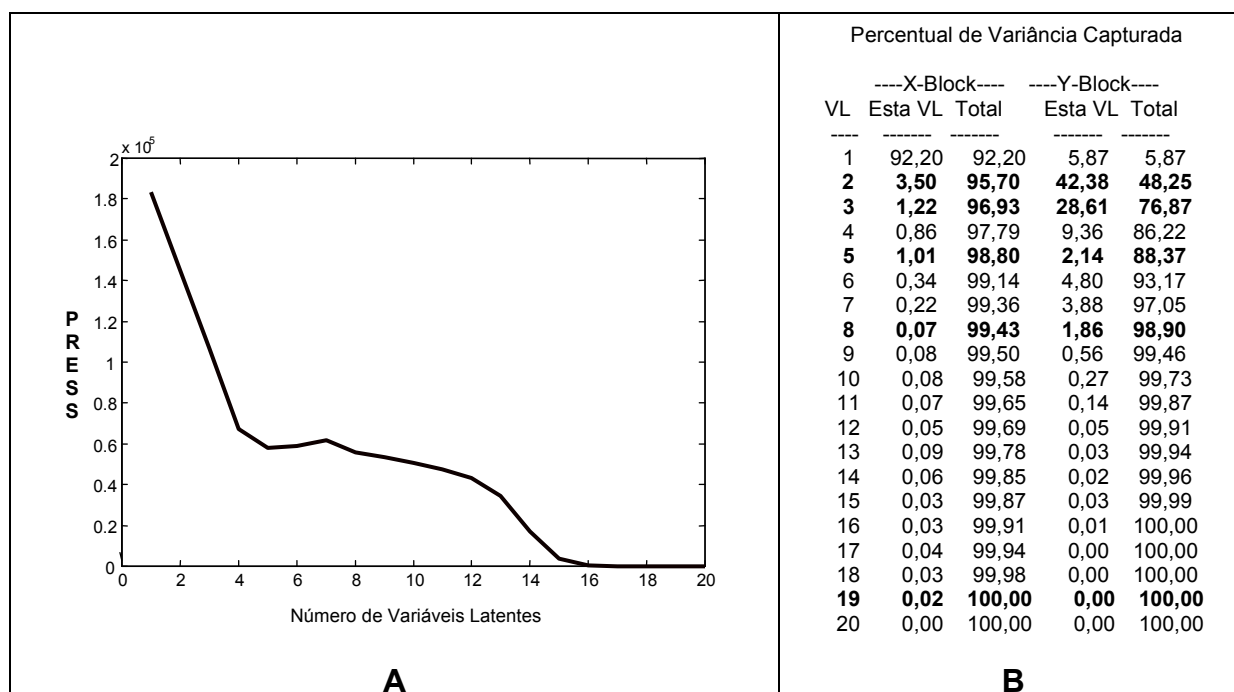


FIGURA 34. GRÁFICO DE PRESS (A) E VARIÂNCIA CAPTURADA PELAS VARIÁVEIS LATENTES (B) NO MODELO DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDO COM ESPECTROS COMPLETOS (7001-399 cm⁻¹).

Trabalhando-se na região do infravermelho médio (4000 a 399 cm⁻¹) e do infravermelho próximo (7001 a 4000 cm⁻¹), resultados muito similares foram observados. Para manter a coerência e viabilizar a obtenção de resultados comparáveis, modelos foram desenvolvidos com 19, 8, 5 e 3 variáveis latentes, cuja capacidade de previsão pode ser verificada nas Tabelas 20 e 21, respectivamente.

Desta vez, observa-se que os menores erros de previsão estão associados ao uso de 5 VL's, entretanto, erros de previsão superiores a 5% foram observados.

Uma rápida avaliação dos resultados, resumidamente apresentados na Figura 35, permite verificar que os melhores modelos de calibração estão representados por aqueles que envolvem o uso de espectros integrais (7001 A 399 cm⁻¹) e 8 variáveis latentes. Neste caso, o erro de previsão se mantém abaixo de 5%, para ambas espécies em estudo. Menores erros de previsão para SMZ podem ser conseguidos na região do MID e trabalhando-se com 19 VLs (3,0%). Entretanto, nestas condições a previsão de TMP se mostra desfavorável, com erros de 8%.

TABELA 19. RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg g^{-1} E ERRO RELATIVO EM %), UTILIZANDO-SE MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS DRIFT NA REGIÃO DE 7001 A 399 cm^{-1} .

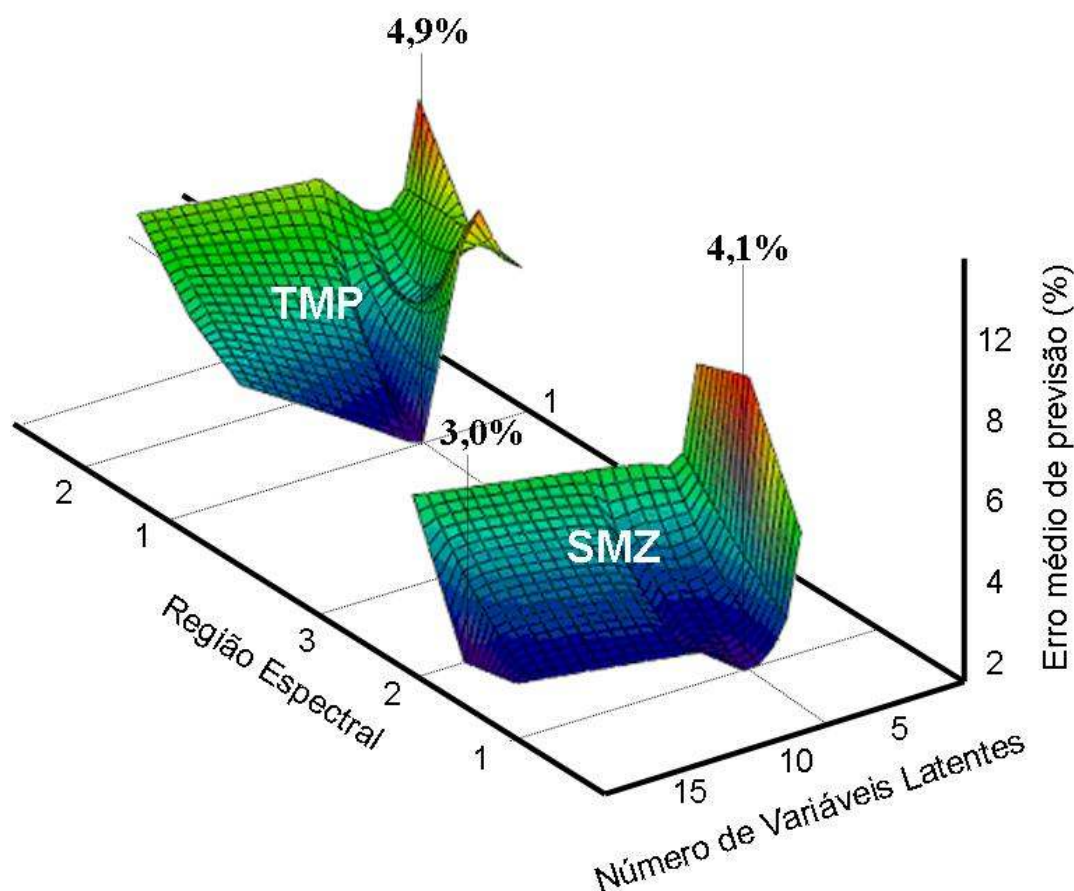
CONCENTRAÇÃO REAL		Número de variáveis latentes															
		19 VL				8 VL				5 VL				3 VL			
SMZ	TMP	SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO	
560,0	127,0	525,0	136,0	6,2	7,5	522,0	135,0	6,8	6,2	543,0	144,0	3,0	13,1	555,0	143,0	0,9	12,9
628,0	155,0	633,0	139,0	0,9	10,3	635,0	145,0	1,1	6,7	624,0	134,0	0,6	13,5	667,0	141,0	6,3	9,2
763,0	127,0	762,0	126,0	8,8	11,2	833,0	139,0	9,1	9,8	840,0	146,0	10,1	15,1	795,0	138,0	4,3	8,6
763,0	168,0	762,0	160,0	0,1	4,8	769,0	170,0	0,8	1,2	761,0	156,0	0,2	7,2	737,0	138,0	3,4	17,8
830,0	141,0	808,0	137,0	2,7	2,7	808,0	142,0	2,6	0,5	814,0	157,0	1,9	11,2	772,0	139,0	7,0	1,5
Valor médio				3,73	7,24			4,1	4,9			3,2	12,0			4,4	10,0

TABELA 20. RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg g⁻¹ E ERRO RELATIVO EM %), UTILIZANDO-SE MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS DRFIT NA REGIÃO DE 4000 A 399 cm⁻¹.

CONCENTRAÇÃO REAL		Número de variáveis latentes															
		19 VL				8 VL				5 VL				3 VL			
SMZ	TMP	SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO	
560,0	127,0	530,0	143,0	5.4	12.9	568,0	138,0	1.4	8.9	589,0	143,0	5.2	12.3	593,0	146,0	5.9	15.4
628,0	155,0	619,0	135,0	1.4	12.9	609,0	133,0	3.0	14.3	618,0	139,0	1.6	10.1	633,0	143,0	0.8	7.9
763,0	127,0	782,0	119,0	2.6	6.1	745,0	121,0	2.3	4.9	786,0	130,0	3.1	2.6	771,0	134,0	1.1	5.8
763,0	168,0	742,0	158,0	2.7	5.9	693,0	157,0	9.2	6.6	706,0	164,0	7.5	2.4	677,0	142,0	11.2	15.4
830,0	141,0	854,0	144,0	2.9	2.3	823,0	141,0	0.8	0.1	800,0	133,0	3.5	5.4	780,0	134,0	5.9	5.2
Valor médio				3,0	8,0			3,3	7,0			4,2	6,6			5,0	9.9

TABELA 21. RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS MISTURAS SINTÉTICAS RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg g⁻¹ E ERRO RELATIVO EM %), UTILIZANDO-SE MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS DRIFT NA REGIÃO DE 7001 a 4000 cm⁻¹.

CONCENTRAÇÃO REAL		Número de variáveis latentes															
		19				8				5				3			
SMZ	TMP	SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO	
560,0	127,0	542,0	142,0	3.2	12.0	544,0	141,0	2.9	10.8	532,0	150,0	5.0	17.9	549,0	154,0	2.0	21.5
628,0	155,0	663,0	151,0	5.7	2.6	670,0	148,0	6.6	4.6	650,0	144,0	3.5	6.9	666,0	147,0	6.1	5.4
763,0	127,0	805,0	146,0	5.5	15.3	802,0	147,0	5.2	15.7	816,0	134,0	7.0	5.5	784,0	127,0	2.8	0.1
763,0	168,0	711,0	149,0	6.8	11.1	705,0	148,0	7.6	11.7	718,0	144,0	5.9	14.4	709,0	138,0	7.1	17.7
830,0	141,0	712,0	130,0	14.2	7.6	714,0	130,0	14.0	8.0	706,0	141,0	14.9	0.1	690,0	140,0	16.9	1.1
Valor médio				7,1	9,7			7,3	10,2			7,3	9,0			7,0	9,2



LEGENDA: Região Espectral:
 1- Região de 7001 a 399 cm^{-1} .
 2 - Região de 7001 a 4000 cm^{-1} .
 3 - Região de 4000 a 399 cm^{-1} .

FIGURA 35. REPRESENTAÇÃO DO ERRO MÉDIO DA PREVISÃO DE SMZ E TMP, EM FUNÇÃO DA REGIÃO ESPECTRAL PROCESSADA E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES.

5.2.2. Construção de Modelos Multivariados com Espectros Pré-tratados

Embora bons resultados tenham sido observados com modelos desenvolvidos a partir de espectros que não receberam nenhum tipo de pré-processamento, sabe-se que esta condição costuma ser desfavorável nos estudos envolvendo DRIFT. Em geral, a utilização de sistemas de processamento prévio de sinal favorece o desenvolvimento de modelos multivariados, principalmente quando as ferramentas estão orientadas á minimização das discrepâncias relacionadas com o processo de reflexão.

Neste estudo foi utilizada a região espectral compreendida entre 7001 e 399 cm^{-1} , região que possibilita o menor erro de previsão, conforme ilustrado na Figura 36. Visando uma melhor separação de sinais, foi utilizada uma rotina de derivação seguida de alisamento (SAVITZKY-GOLAY). Para aumentar a significância de sinais pouco expressivos, utilizou-se uma rotina de autoescalamento. Finalmente, para aumentar a razão sinal/ruído e corrigir a linha de base, utilizou-se o processo de correção multiplicativa de sinais (MSC).

O desenvolvimento de modelos fundamentados em sinais derivados e alisados obedeceu aos mesmos padrões de desenvolvimento dos anteriores, procurando sempre o número ideal de variáveis latentes para produzir o menor erro de previsão. Os espectros em primeira derivada seguida de alisamento são apresentados na Figura 36, enquanto que a evolução do PRESS em função do número de variáveis latentes é apresentada na Figura 37.

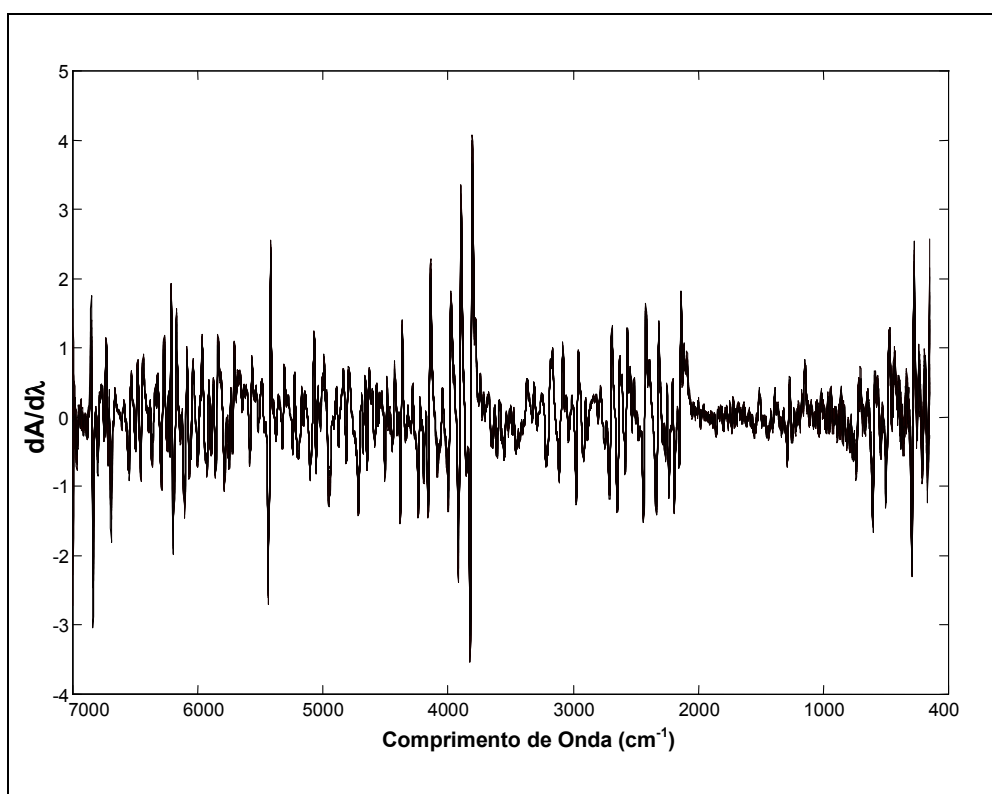


FIGURA 36. ESPECTROS DRIFT EM PRIMEIRA DERIVADA SEGUIDA DE ALISAMENTO DAS MISTURAS DE SMZ E TMP UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO MULTIVARIADO.

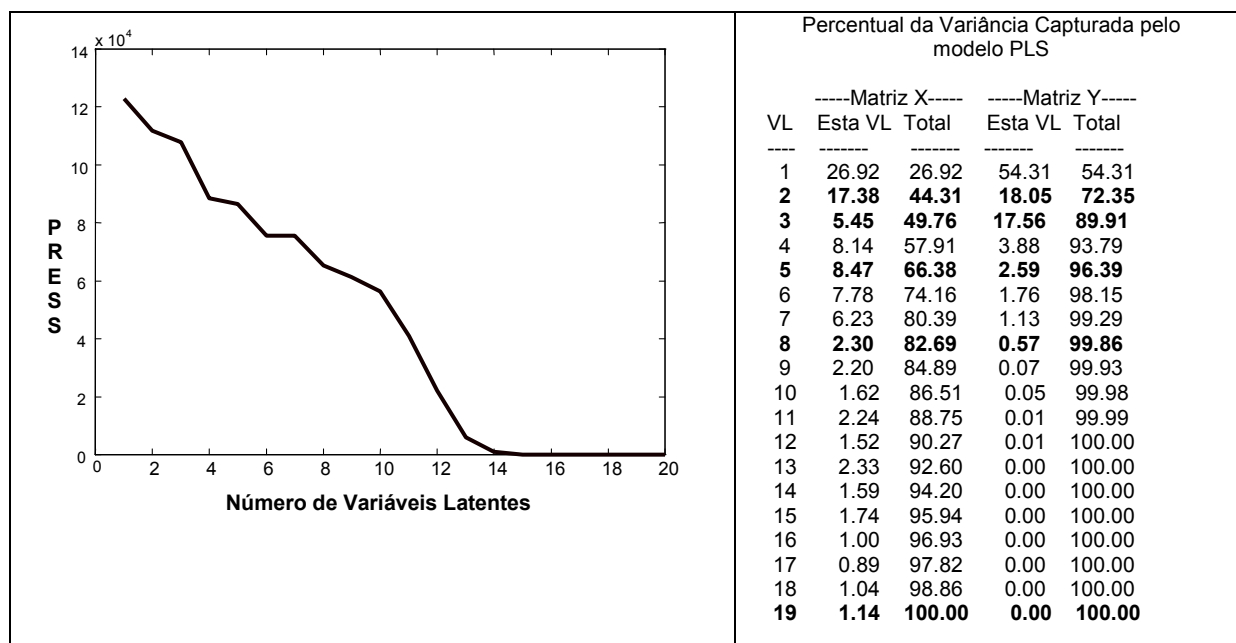


FIGURA 37. GRÁFICO DE *PRESS* X VL E VALORES DA VARIÂNCIA CAPTURADA PELAS VARIÁVEIS LATENTES NO MODELO DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDO COM ESPECTROS EM PRIMEIRA DERIVADA SEGUIDA DE ALISAMENTO.

De acordo com os resultados originados no processo de validação cruzada (sistema *leave-one-out*), o menor erro de previsão é conseguido com 19 variáveis latentes. Entretanto, observa-se que grande parte da variância na matriz de concentração (Y) pode ser representada por um número bastante menor de VLs. Em função deste antecedente, modelos com 19, 8, 5 e 3 VLs foram desenvolvidos, modelos estes que permitiram a obtenção dos resultados apresentados na Tabela 22.

Utilizando-se idênticos argumentos, modelos foram desenvolvidos após pré-processamento por autoescalamento e correção multiplicativa de sinais (MSC). Os resultados da fase de validação são apresentados nas Tabelas, 23 e 24, respectivamente.

Para facilitar um estudo comparativo, os erros de previsão foram graficados em função do número de variáveis latentes e do tipo de pré-processamento, na Figura 38.

TABELA 22. RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS MISTURAS SINTÉTICAS DE SMZ E TMP RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg g^{-1} E ERRO RELATIVO EM %), UTILIZANDO-SE MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS DRIFT EM PRIMEIRA DERIVADA E ALISADOS, NA REGIÃO DE 7001 a 399 cm^{-1} .

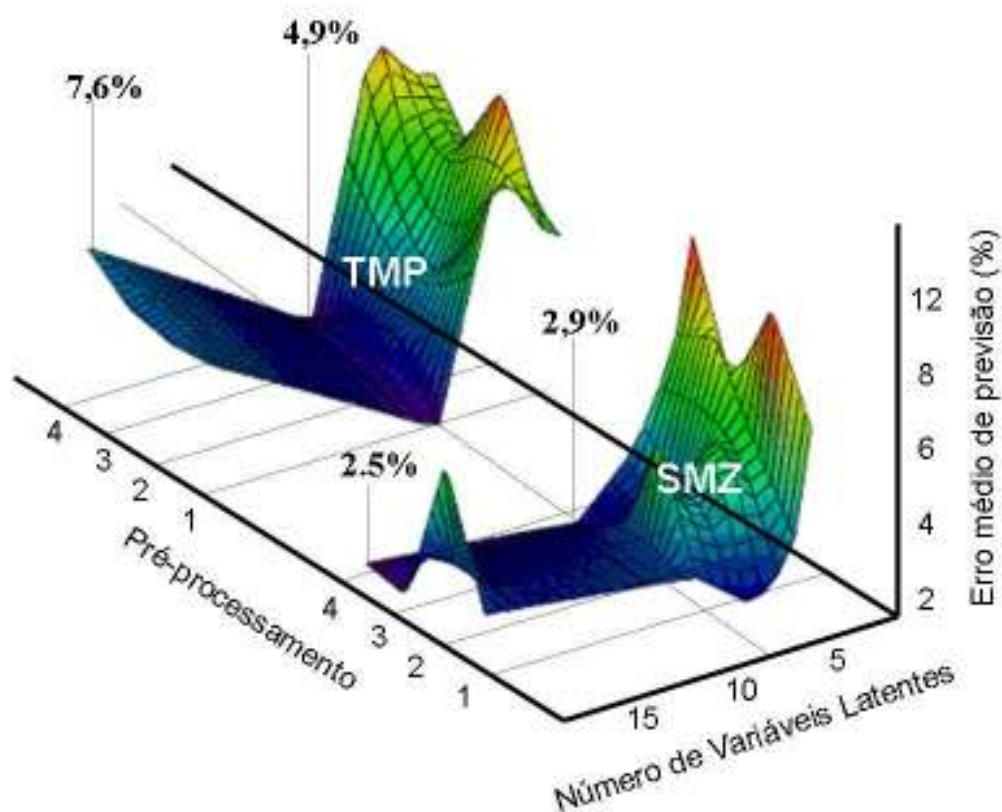
CONCENTRAÇÃO REAL		Número de variáveis latentes															
		19				8				5				3			
SMZ	TMP	SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO	
560,0	127,0	547,7	139,5	-2,2	9,8	545,5	139,7	-2,6	10,0	538,9	142,2	-3,8	11,9	553,0	149,2	-1,2	17,4
628,0	155,0	669,8	149,5	6,6	-3,5	669,6	150,8	6,6	-2,7	683,7	138,4	8,9	-10,7	653,6	131,7	4,1	-15,1
763,0	127,0	756,7	135,3	-0,8	6,5	756,2	135,1	-0,9	6,3	747,8	138,9	-2,0	9,4	773,6	146,5	1,4	15,4
763,0	168,0	683,5	158,0	-10,4	-6,0	682,7	157,0	-10,5	-6,5	699,7	159,0	-8,3	-5,4	684,7	151,4	-10,3	-9,9
830,0	141,0	713,4	129,0	-14,0	-8,5	713,7	131,5	-14,0	-6,8	698,6	144,1	-15,8	2,2	731,4	153,2	-11,9	8,7
VALOR MÉDIO				6,8	6,9			6,9	6,5			7,8	7,9			5,8	13,3

TABELA 23. RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS MISTURAS SINTÉTICAS DE SMZ E TMP RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg g⁻¹ E ERRO RELATIVO EM %), UTILIZANDO-SE MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS DRIFT AUTOESCALADOS, NA REGIÃO DE 7001 a 399 cm⁻¹.

CONCENTRAÇÃO REAL		Número de variáveis latentes															
		19				8				5				3			
SMZ	TMP	SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO	
560,0	127,0	542,6	139,4	-3,1	9,8	551,9	135,6	-1,4	6,8	571,7	141,2	2,1	11,2	636,8	140,8	13,7	10,9
628,0	155,0	631,5	138,3	0,5	10,8	630,3	137,7	0,4	11,2	633,6	139,8	0,9	-9,8	682,5	133,1	8,7	-14,1
763,0	127,0	811,8	133,1	6,4	4,8	819,4	135,6	7,4	6,8	816,9	140,3	7,1	10,5	764,4	147,0	0,2	15,8
763,0	168,0	758,0	155,6	-0,6	-7,3	736,8	161,7	-3,4	-3,7	738,8	161,7	-3,2	-3,7	667,1	165,5	-12,6	-1,5
830,0	141,0	815,6	138,7	-1,7	-1,7	818,9	138,9	-1,3	-1,5	812,0	146,5	-2,2	3,9	764,9	154,3	-7,8	9,4
VALOR MÉDIO				2,49	6,88			2,8	6,0			3,1	7,8			8,6	10,3

TABELA 24. RESULTADOS DA PREVISÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS MISTURAS SINTÉTICAS DE SMZ E TMP RESERVADAS PARA VALIDAÇÃO (CONCENTRAÇÕES EXPRESSAS EM mg g⁻¹ E ERRO RELATIVO EM %), UTILIZANDO-SE MODELOS DESENVOLVIDOS COM ESPECTROS DRIFT SUBMETIDOS A CORREÇÃO MULTIPLICATIVA DE SINAIS, NA REGIÃO DE 7001 a 399 cm⁻¹.

CONCENTRAÇÃO REAL		Número de variáveis latentes															
		19				8				5				3			
SMZ	TMP	SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO		SMZ	TMP	ERRO	
560,0	127,0	554,1	142,8	-1,1	12,5	553,5	142,1	-1,2	11,9	570,0	152,5	1,8	20,1	570,4	152,8	1,9	20,3
628,0	155,0	631,0	140,0	0,5	-9,7	621,5	143,9	-1,0	-7,2	605,5	133,9	-3,6	-13,6	682,9	137,7	8,7	-11,2
763,0	127,0	766,7	129,4	0,5	1,9	763,6	129,2	0,1	1,7	786,5	137,7	3,1	8,4	735,7	135,5	-3,6	6,7
763,0	168,0	755,4	159,1	-1,0	-5,3	746,5	168,9	2,2	0,5	712,3	137,9	-6,6	-17,9	731,0	137,7	-4,2	-18,0
830,0	141,0	752,9	128,9	-9,3	-8,6	745,7	136,6	10,2	-3,1	759,7	144,2	-8,5	2,3	688,3	141,2	-17,1	0,2
VALOR MÉDIO				2,5	7,6			2,9	4,9			4,7	12,5			7,1	11,3



LEGENDA: Tipos de Pré-Processamento:

- 1 - Sem
- 2 - Primeira Derivada e Alisado.
- 3 - Autoescalado.
- 4 - MSC.

FIGURA 38. REPRESENTAÇÃO DO ERRO MÉDIO DA PREVISÃO DE SMZ E TMP, EM FUNÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES.

Tal como pode ser observado na Figura 38, o menor conjunto de erros de previsão se dá com oito variáveis latentes e com espectros pré-processados por MSC. Neste caso, erros de previsão inferiores a 5% são observados para ambas espécies em estudo.

5.2.3. Análise de Amostras Reais (Medicamentos)

Em função dos resultados preliminares, amostras reais de medicamentos foram analisadas utilizando-se o modelo desenvolvido com 8 VL's e pré-processamento fundamentado no sistema MSC.

Os resultados, sumarizados na Tabela 25, apresentam-se completamente inadequados, com erros de previsão extremamente elevados. Em primeira instância, é possível assumir que discrepâncias deste tipo sejam devidas á presença de excipientes, espécies que, não sendo consideradas na modelagem, introduzem modificações espectrais que inviabiliza a adequada previsão das espécies de interesse.

TABELA 25. RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS UTILIZANDO-SE O MELHOR MODELO MULTIVARIADO.

Amostras	Concentração Real (mg g ⁻¹)		Concentração Prevista (mg g ⁻¹)		Erro (%)	
	SMZ	TMP	SMZ	TMP	SMZ	TMP
Qiftrim	594,9	119,0	1144,0	359,9	-92,31	-202,49
Bac Sulftrin	641,1	128,2	1188,9	330,6	-85,44	-157,82
Infectrin	789,1	157,0	879,7	291,2	-11,48	-85,48
Fio Cruz	626,4	125,3	1106,7	356,2	-76,68	-184,35
Bactrim	789,1	157,8	883,0	291,9	-11,90	-84,96

Visando verificar com melhor precisão as causas desta deficiente capacidade de previsão, estudos adicionais foram realizados por análise de componentes principais (PCA), principalmente visando a identificação de significativas diferenças de sinal entre padrões de calibração e amostras de medicamentos.

Neste estudo, trinta amostras foram submetidas á rotina de PCA. Vinte correspondem ás misturas sintéticas utilizadas na etapa de calibração, cinco a misturas utilizadas na validação e cinco a amostras de medicamentos.

A atenta observação deste conjunto de espectros (Figura 39) permite identificar certas diferenças, as quais podem ser responsáveis pela deficiência dos modelos desenvolvidos. Entretanto, esta diferenciação fica perfeitamente esclarecida a partir de gráfico de *scores*, apresentado na Figura 40. Este parâmetro, que representa a coordenada de cada amostra no sistema de eixos formado pelas novas componentes principais (CP1 e CP2), indica que as amostras 26 a 30 (medicamentos) são perfeitamente diferenciáveis do resto do conjunto.

No gráfico de *loadings* (Figura 41), que representa a importância que cada variável original teve na elaboração da primeira componente principal, é possível verificar três grupos de sinais de maior relevância, centrados em 2360, 2916 e 3545 cm^{-1} . Se admitirmos que a primeira componente principal permite uma importante diferenciação das amostras de medicamentos e que existem três grupos de sinais de importância na elaboração desta componente, certamente podemos admitir que a diferenciação pode estar associada a estas regiões espectrais.

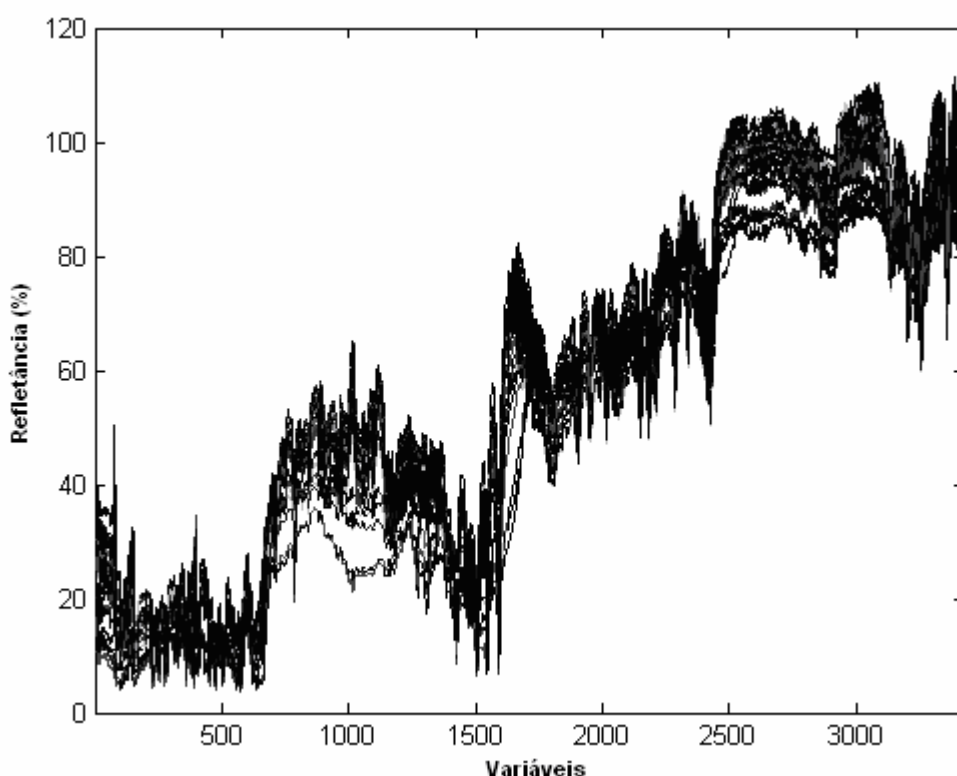


FIGURA 39. ESPECTROS DAS 30 AMOSTRAS UTILIZADAS NOS ESTUDOS POR ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.

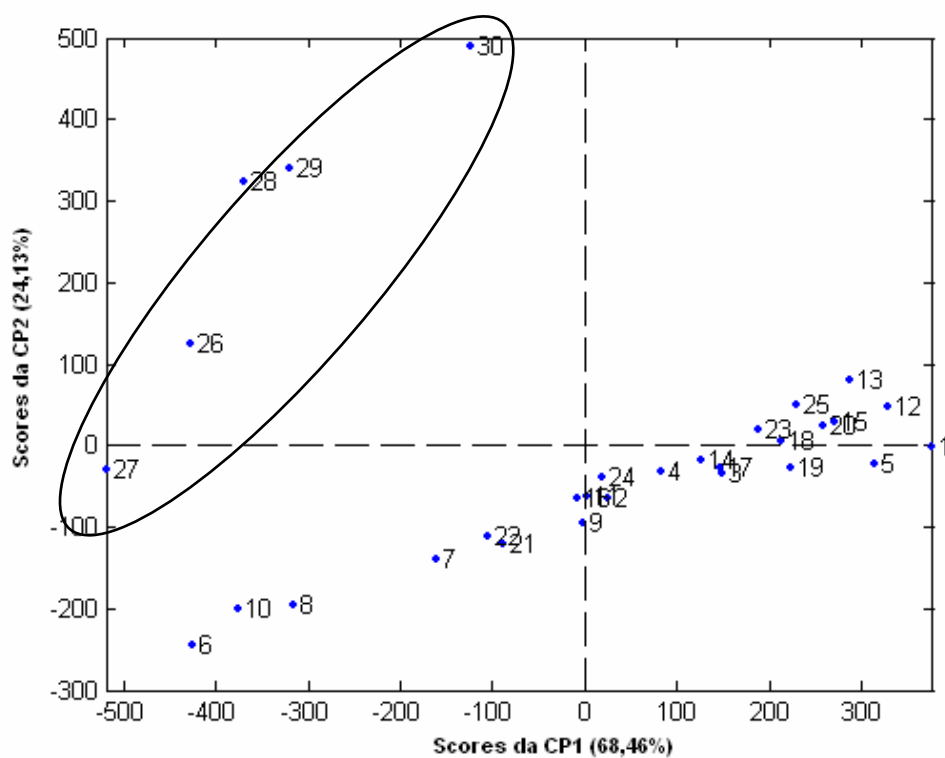


FIGURA 40. GRÁFICO DE SCORES DA CP1 COM CP2.

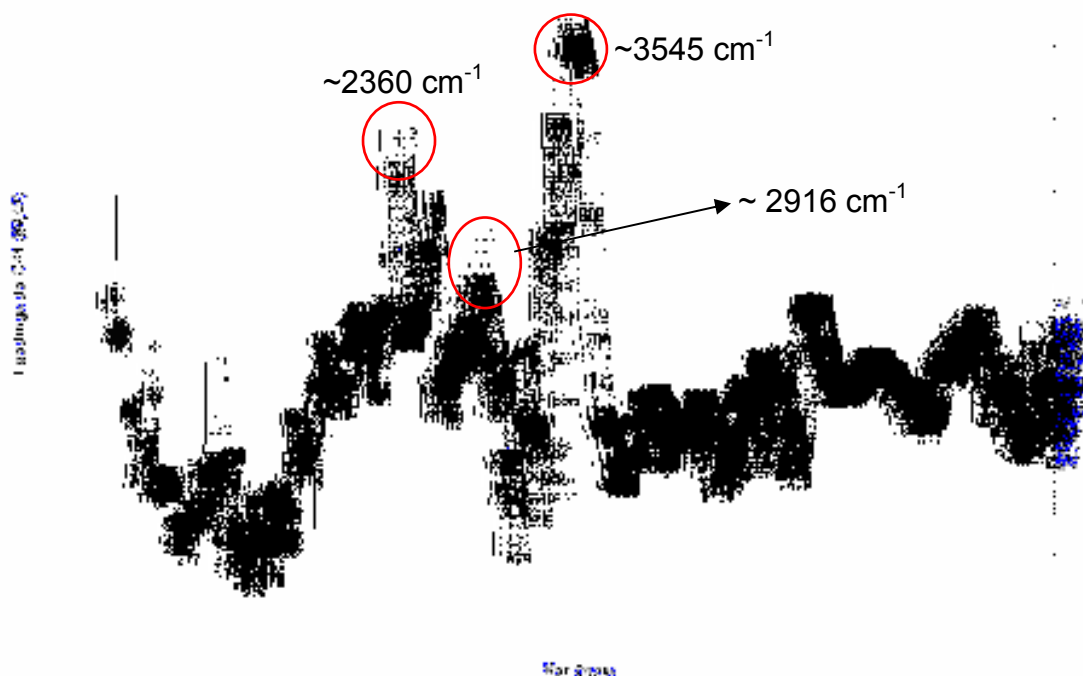


FIGURA 41. GRÁFICO DE LOADINGS DA PRIMEIRA COMPONTE PRINCIPAL.

A primeira região espectral ($\sim 2360\text{ cm}^{-1}$) realmente mostra comportamentos diferenciados entre amostras e padrões de calibração (Figura 42). Entretanto, trata-se de uma região que caracteriza estiramentos do grupo C-N, os quais dificilmente fazem parte da molécula de algum excipiente.

Na segunda região espectral ($\sim 2916\text{ cm}^{-1}$) também podem ser observadas diferenças significativas entre padrões e amostras (Figura 43). Neste caso, trata-se de sinais característicos de estiramento de grupos C-H, os quais fazem parte da molécula de estearato, excipiente bastante utilizado em produtos farmacêuticos deste tipo e positivamente identificado nas amostras de Bactrim e Infectrin.

A terceira região espectral ($\sim 3545\text{ cm}^{-1}$) tal vez seja a de maior diferenciação (Figura 44), correspondendo á banda de estiramento do grupo C-O, característica de outros dois excipientes, a carboximetilcelulose e a carboximetilamida, positivamente identificadas nas amostras de Bactrim e Infectrin.

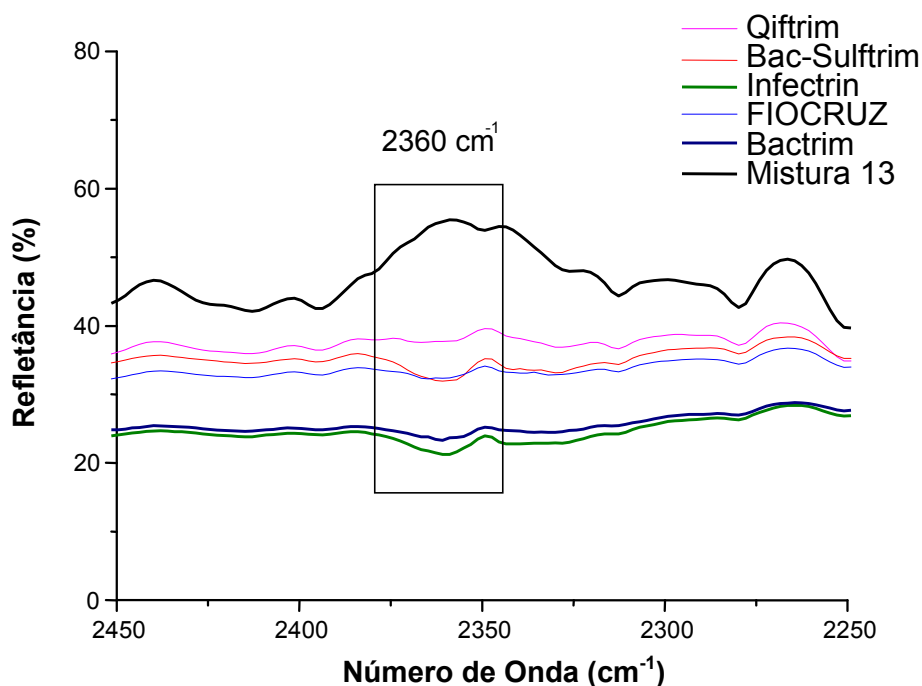


FIGURA 42. ESPECTROS DRIFT DAS AMOSTRAS REAIS E DE UMA MISTURA COM ENFASE NA REGIÃO ESPECTRAL PRÓXIMA DE 2360 cm^{-1} .

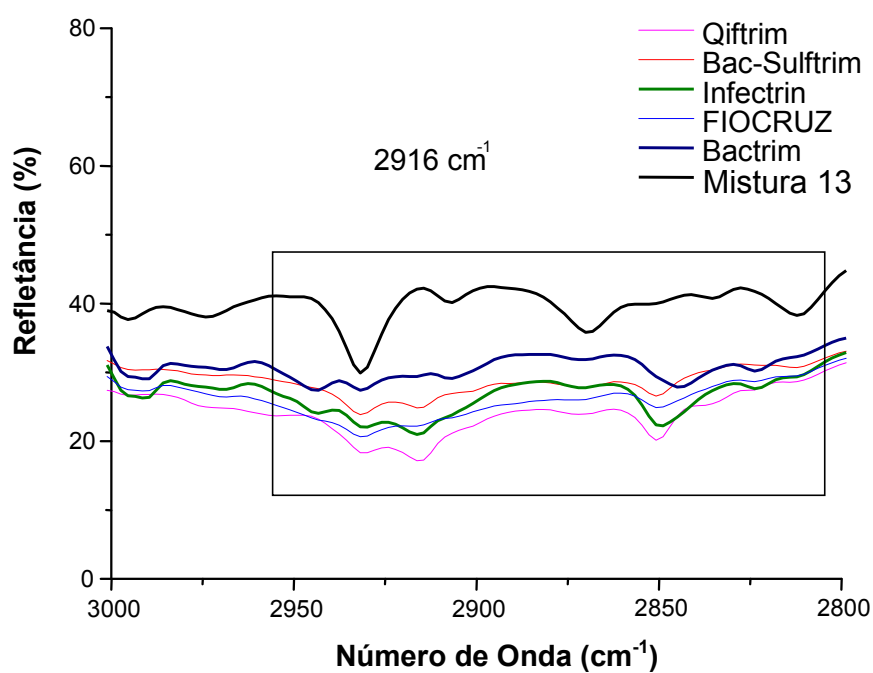


FIGURA 43. ESPECTROS DRIFT DAS AMOSTRAS REAIS E DE UMA MISTURA COM ENFASE NA REGIÃO ESPECTRAL PRÓXIMA DE 2916 cm^{-1} .

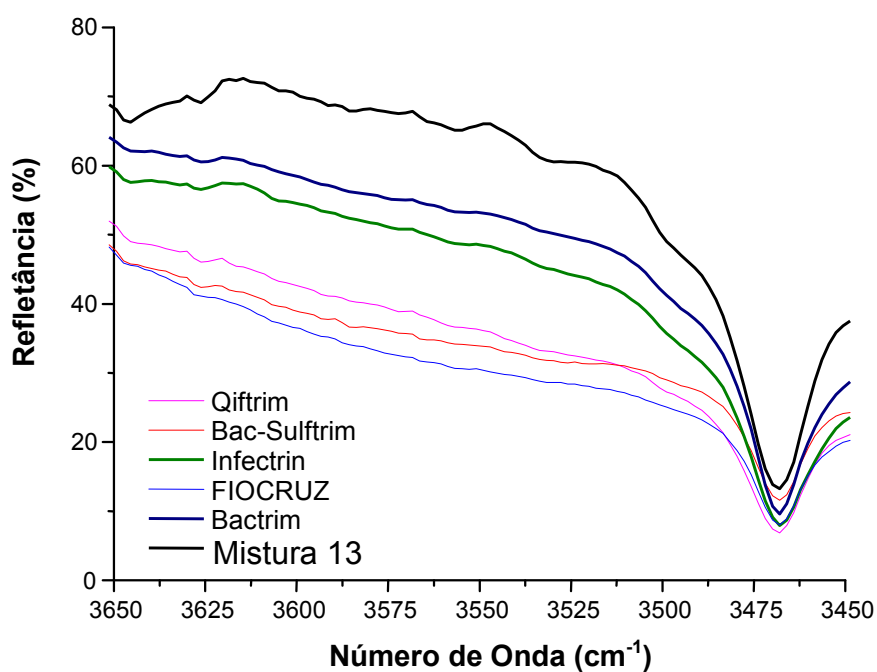


FIGURA 44. ESPECTROS DRIFT DAS AMOSTRAS REAIS E DE UMA MISTURA COM ENFASE NA REGIÃO ESPECTRAL PRÓXIMA DE 3545 cm^{-1} .

Com base nestes antecedentes, é possível confirmar a responsabilidade dos excipientes em relação á perda de capacidade de previsão dos modelos multivariados desenvolvidos. Para resolução destes problemas, duas alternativas:

a). Desenvolvimento de modelos fundamentados em regiões não interferidas pelo sinal dos excipientes,

b). Desenvolvimento de modelos a partir de padrões de calibração que contenham os excipientes em questão.

6. CONCLUSÕES

Em função dos resultados conseguidos, é possível concluir que:

6.1. ESPECTROSCOPIA UV-VIS

i. Os sérios problemas de interferência espectral observados na espectroscopia UV-Vis inviabilizam a quantificação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprim, recorrendo-se a modelos de calibração univariados.

ii. Os problemas de interferência podem ser minimizados pela utilização de modelos elaborados em primeira derivada ou empregando-se sistemas de equações que levam em consideração a interferência existente. Embora melhorados, os resultados apresentam discrepâncias acima dos limites exigidos pela legislação vigente.

iii. Praticamente toda a informação relevante contida nos espectros pode ser representada por um conjunto de poucas variáveis latentes. Esta redução de dimensionalidade permite à utilização de toda a informação existente, onde favorece o desenvolvimento de modelos multivariados que contornam os problemas de interferência espectral.

iv. Modelos de calibração elaborados por técnicas de regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR) apresentam boa capacidade preditiva. Na fase de validação, realizada a partir da análise de cinco misturas sintéticas, erros de previsão inferiores a 3% foram observados, para ambos os fármacos em estudo.

v. O pré-processamento de sinais (ex. primeira derivada, primeira derivada seguida de alisamento e autoescalamento) não induz significativas melhoras nos modelos de calibração desenvolvidos.

vi. A capacidade preditiva dos modelos multivariados se vê seriamente comprometida pelas mudanças espectrais ocasionadas por variações de pH. Na análise de amostras reais (medicamentos) este fator tem especial importância, em razão da presença de excipientes que modificam o referido parâmetro.

6.2. ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO POR REFLETÂNCIA DIFUSA

i. Praticamente toda a informação relevante contida nos espectros pode ser representada por um conjunto de poucas variáveis latentes. Esta redução de dimensionalidade permite à utilização de toda a informação existente, o que favorece o desenvolvimento de modelos multivariados que contornam os problemas originados pela complexidade do sinal espectral. Dentro deste contexto, destaque pode ser dado a modelos elaborados entre 7001 e 399 cm^{-1} , assistidos por correção multiplicativa de sinal (MSC).

ii. Modelos de calibração elaborados por rotinas de regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR) apresentam boa capacidade preditiva. Na fase de validação, realizada a partir da análise de cinco misturas sintéticas, erros de previsão inferiores a 5% foram observados, para ambos os fármacos em estudo.

iii. A análise de amostras reais (medicamentos) leva à obtenção de erros de previsão extremamente elevados, principalmente em razão de modificações espectrais ocasionadas pela presença de substâncias não modeladas, como por exemplo, os excipientes.

7. TRABALHOS FUTUROS

A realização deste trabalho permitiu evidenciar inúmeros aspectos relevantes da calibração multivariada, aspectos estes que permitiram reconhecer necessidades que podem ser tema de trabalhos futuros.

Dentre outros, é possível destacar:

- i. Estudos orientados ao desenvolvimento de metodologias espectroscópicas multivariadas com potencial para formar parte de rotinas de controle de qualidade de produtos farmacêuticos, o que envolve a resolução de problemas gerados pela presença de excipientes,
- ii. Desenvolvimento de rotinas de controle *on-line*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDI, H.; Partial Least Squares (PLS) Regression. In M. Lewis-Beck, A. Bryman, T. Futing (Eds); *Encyclopedia for Research Methods for the Social Sciences*. **2003**.
- ABIMG – Associação Brasileira das Industrias de Medicamentos Genericos; <http://www.progenericos.org.br>. Acessada em 20 de junho de **2004**.
- AHRER, W.; SCHERWENK, E.; BUCHBERGER, W.; Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 910, **2001**, 69.
- AKAY, C.; OZKAN, S. A.; Simultaneous LC determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, **2002**, 1207.
- ANVISA. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 que determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília: Diário Oficial da União, 02 fev. **2003**.
- ARANCIBIA, J. A.; NEPOTE, A. J.; ESCANDAR, G. M.; OLIVIERI A. C.; Spectrofluorimetric determination of phenylephrine in the presence of a large excess of paracetamol. *Anal. Chim. Acta*, 419, **2000**, 159.
- BENAMOR, M.; BELHAMEL, K.; DRAA, M. T.; Use of xylenol orange and cetylpyridinium chloride in rapid spectrophotometric determination of zinc in pharmaceutical products; *J. Pharm. Biomed. Anal*, 23, **2000**, 1033.
- BERMUDEZ, J.; Medicamentos Genéricos: Uma alternativa para o mercado brasileiro; *Cad. Saúde Públ.*, 10, jul/set, **1994**, 368.
- BERZAS NEVADO, J. J.; CASTAÑEDA PEÑALVO, G.; GUZMÁN BERNARDO, F. J.; Determination of sulfametoxazole, sulfadiazine and associated compounds in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 918, **2001**, 205.
- BOERIS, M. S.; LUCO, J. M.; OLSINA R. A.; Simultaneous spectrophotometric determination of phenobarbital, phenytoin and methylphenobarbital in pharmaceutical preparations by using partial least-squares and principal component regression multivariate calibration. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24, **2000**, 259.
- BRASIL. Lei nº 6360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, **1976**.

- BRO, R.; Multivariate calibration. What is in chemometrics for the analytical chemist?. *Anal. Chim. Acta*, 500, **2003**, 185.
- CARAPUÇA, H.M.; CABRAL, D.J.; ROCHA, L.S.; Adsorptive stripping voltammetry of trimethoprim: Mechanistic studies and application to the fast determination in pharmaceutical suspensions. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 38, **2005**, 364.
- CCS-Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina; <http://www.ccs.ufsc.br/farmacia/TCCGenericos/sulfametoxazol/farmacologia> acessada em 10 de abril de **2004**.
- CENGİZ, S.; KARACA, A. C.; ÇAKIR, S.; ÜNER, H. B.; SEVINDIK, A.; SEM-EDS analysis and discrimination of forensic soil. *Forensic Sci. Int.*, 141, **2004**, 33.
- COM CIÊNCIA, Revista eletrônica de jornalismo científico (SBPC/Labjor Brasil). <http://www.comciencia.br/reportagens/farmacos/farma02.htm>, acessada em 20 de junho de **2004**.
- COSCIONE, A.R.; O uso de calibração multivariada para determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e ferro: aplicação na análise de plantas e solos. *Tese de Doutorado*, IQ-UNICAMP, **2001**.
- CRIADO, A.; CÁRDENAS, S.; GALLEGRO, M.; VALCÁRCEL, M.; Continuous flow spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceuticals following continuous microwave assisted alkaline hydrolysis. *Talanta*, 53, **2000**, 417.
- CROUBELS, S.; BAERE, S.; BACKER, P.; Comparison of a liquid chromatographic method with ultraviolet and ion-trap tandem mass spectrometric detection for the simultaneous determination of sulfadiazine and trimethoprim in plasma from dogs. *J. Chromatogr. B*, 788, **2003**, 167.
- DAVIDSON, M.W., PARRY-HILL, M. J., SUTTER, R. T., 2005. Reflection of Light. <http://micro.magnet.fsu.edu/optics/lightandcolor/reflection.html>. Acessado em 20 de maio **2006**.
- DILLON, P.F.; ROOT-BERNSTEIN, R.S.; SEARS, P.R.; OLSON L.K.; Natural electrophoresis of norepinephrine and ascorbic acid. *Biophys. J.*, 79, **2000**, 370.
- FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, M. L.; ORTEGA BARRALES, P.; RODRÍGUEZ TORNÉ G.; MOLINA DÍAZ, A.; A flow injection sensor for simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by using Sephadex SP C-25 for continuous on-line separation and solid phase UV transduction. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 31, **2003**, 669.
- FERRÃO, M.F.; Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos. *Tecno-lógica*, 5, **2001**, 63.
- FERRARINI, H. Determinação de teores nutricionais do milho por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada. *Dissertação de Mestrado*, DQ-UFPR, **2004**.

- FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O.; Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. *Quim. Nova*, 22, **1999**, 724.
- FULLER, M.P.E; GRIFFITHS,P.R. Diffuse Reflectance Measurements by Infrared Fourier Transform Spectroscopy. *Anal Chem*, 50, **1978**, 1906.
- FURUSAWA, N.; Rapid high-performance liquid chromatographic identification/quantification of total vitamin C in fruit drinks; *Food Control*, 12, **2001**, 27.
- GORRY, P. A., General least-squares smoothing and differentiation by the convolution (Savitzky-Golay) method, *Anal. Chem*, 62, **1990**, 570.
- GUNNAR, T.; MYKKÄNEN, S.; ARINIEMI, K.; LILLSUNDE, P.; Validated semiquantitative/quantitative screening of 51 drugs in whole blood as silylated derivatives by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry and gas chromatography electron capture detection. *J. Chromatogr. B*, 806, **2004**, 205.
- HOPKE, P. K.; The evolution of chemometrics. *Anal. Chim. Acta*, 500, **2003**, 365.
- ICH. Guidance for Industry. Q2B - Validation of analytical procedures: Methodology. International Conference on Harmonization, 06 nov. 1996.
- INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008, 2003.
- IVAMA, A. M.; Rauber, T. L.; Gomes, S. M. T.; Hofmeister, M. G. S.; Jaramillo, N. M.; Cordeiro, F.; Prevenção e combate à falsificação e fraude de medicamentos: uma responsabilidade compartilhada. *Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, **2004**.
http://www.opas.org.br/medicamentos/docs/HSE_FAL.pdf.
- KESIMLI, B. E TOPACLI, A.; Infrared studies on Co and Cd complexes of sulfamethoxazole. *Spectrochim Acta A*,57,**2001**,1031.
- LANG, P. L.; KEEFER, C. D.; JUENEMANN, J. C.; TRAN, K. V.; PETERS, S. M.; HUTH, N. M.; JOYAUX, A. G.; The infrared microspectroscopic and energy dispersive X-ray analysis of paints removed from a painted, medieval sculpture of Saint Wolfgang. *Microchem. J.*,74, **2003**, 33.
- LAPORTE, J. R.; Para melhor uso dos medicamentos. Disponível em: <http://www.taps.org.br/medcrise10.htm>, acessado em 20 de junho de **2005**.
- LEHR, G. J.; BARRY, T. L.; FRANOLIC, J. D.; PETZINGER, G.; SCHEINER, P.; LC determination of impurities in methoxsalen drug substance: isolation and identification of isopimpinellin as a major impurity by atmospheric pressure chemical ionization LC/MS and NMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 33, **2003**,627.
- LEITE, F. Validação em análise química. 4ª Ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2002.

- LEMUS GALLEGO, J. M.; PÉREZ ARROYO, J.; Simultaneous determination of dexamethasone and trimethoprim by liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, **2002**, 1255.
- LEMUS GALLEGO, J. M.; PÉREZ ARROYO, J.; Spectrophotometric resolution of ternary mixtures of Dexamethasone, Polymyxin B and Trimethoprim in synthetic and pharmaceutical formulations. *Anal. Chim. Acta*, 437, **2001**, 247.
- LINDBERG, R.; JARNHEIMER, P-A.; OLSEN, B.; JOHANSSON, M.; TYSKLIND, M.; Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere*, 57, **2004**, 1479.
- LÖFFLER, D.; TERNES, T. A.; Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1021, **2003**, 133.
- LOPEZ-MARTINEZ, L.; LOPEZ-de-ALBA, P. L.; LEO-RODRIGUEZ, L. M.; YEPEZ-MURRIETA, M. L.; Simultaneous determination of binary mixtures of trimethoprim and sulfamethoxazole or sulphamethoxypyridazine by the bivariate calibration spectrophotometric method. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, **2002**, 77.
- 3M-Brasil; <http://www.3m.com/intl/br/news/9/links.jhtml?noticia=3&menuhl=0002>. Acessado em 20 de junho de **2004**.
- MARKOPOULOU, C. K.; MALLIOU, E. T.; KOUNDOURELLIS, J. E.; Chemometric and derivative methods as flexible spectrophotometric approaches for dissolution and assaying tests in multicomponent tablets. *Il Farmaco*, 59, **2004**, 627.
- MARTENS, H.; NAES, T.; *Multivariate Calibration*; John Wiley & Sons; Chichester, England, **1989**.
- MEDINA, A. R.; FERNANDEZ DE CÓRDOVA, M. L.; MOLINA-DIAZ, A.; Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid by means of a FI ultraviolet pls multiptosensing device. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21, **1999**, 983.
- MESSERSCHMIDT, I. Análise quantitativa por espectroscopia no infravermelho médio empregando técnicas de reflectância e calibração multivariada. *Tese de Doutorado*, IQ-UNICAMP, **1999**.
- MORENO GÁLVEZ, A.; GARCÍA MATEO, J. V.; MARTÍNEZ CALATAYUD, J.; Simultaneous dissolution profiles of two drugs, sulfadiazine-trimethoprim and amitriptyline-perphenazine, in solid oral dosage forms by a FIA manifold provided with a single spectrophotometric detector. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, **2002**, 535.

- MSAGATI, T.A. M.E NINDI, M. M.; Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. *Talanta*, 64, **2004**, 87.
- NAGATA, N.; Uso de métodos de calibração multivariada na análise de amostras de interesse industrial e espécies de importância ambiental por fluorescência e raios-X. *Tese de Doutorado*, IQ-UNICAMP, **2001**.
- NI, Y.N.; QI, Z.B.; KOKOT, S.; Simultaneous ultraviolet–spectrophotometric determination of sulfonamides by multivariate calibration approaches. *Chemometr Intell Lab*, 82, **2006**, 241.
- OLINGER, J.M.; GRIFFITHS, P.R.; Effects of sample dilution and particle size/morphology on diffuse reflection spectra of carbohydrate systems in the near and mid infrared. Part I: single analytes. *Appl Spectrosc*, 47, 1993, 687.
- OPAS -Organização Pan-americana de Saúde; <http://www.opas.org.br>. Acessada em 20 de junho de **2004**.
- ÖZDEMİR, D.; ÖZTÜRK, B. Genetic Multivariate Calibration Methods for Near Infrared (NIR) Spectroscopic Determination of Complex Mixtures. *Turk J Chem*, 28, **2004**, 497.
- PATEL, A. D.; LUNER, P. E.; KEMPER, M. S.; Quantitative analysis of polymorphs in binary and multi-component powder mixtures by near-infrared reflectance spectroscopy. *Intern. J. Pharm*, 206, **2000**, 63.
- POLÁEK, M.; JAMBOR, M.; Chemiluminescence determination of antibacterial drug trimethoprim by automated sequential injection technique with permanganate and hexametaphosphate as reagents. *Talanta*, 58, **2002**, 1253.
- REICH, G.; Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. *Adv Drug Deliver Rev*, 57, **2005**, 1109.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*, 27, **2004**, 771.
- ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G.; Estratégias para o aumento de sensibilidade em espectroscopia UV-Vis. *Quim. Nova*, 27, **2004**, 807.
- ROLLEMBERG, M. C. E.; VIDOTTI, E. C.; Espectrofotometria derivativa: uma estratégia simples para a determinação simultânea de corantes em alimentos. *Quim. Nova*, 29, **2006**, 230.
- SABRY, S.M.; Application of 2-acetylbutyrolactone to spectrofluorimetry: Fluorescence properties of Schiff bases derived from 2-acetylbutyrolactone and spectrofluorimetric determination of primary amine-containing compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40, **2006**, 1057.

- SAVITZKY, A.; GOLLAY, M. J. E., Smoothing and Cifferentiaton of Data by Simplified Least Square Procedures, *Anal. Chem.*, 36, **1964**, 1627.
- SENA, M. M.; FERNANDES, J. C. B.; ROVER, L. ; POPPI, R. J.; KUBOTA, L. T.; Application of two- and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and ascorbic acid mixtures using ultraviolet spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta*, 409, **2001**, 159.
- SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T.A. *Princípios de análise instrumental*. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, **2002**.
- SPEED, D. J.; DICKSON, S. J.; CAIRNS, E. R.; KIM, N. D.; Analysis of paracetamol using solid-phase extraction, deuterated internal standards, and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, 25, **2001**, 198.
- SUNKERSETT, M. R.; GRIMSEY, I. M.; DOUGHTY, S. W.; OSBORN, J. C.; YORK, P.; ROWE, R. C.; The changes in surface energetics with relative humidity of carbamazepine and paracetamol as measured by inverse gas chromatography. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 13, **2001**, 219.
- SWIERENGA, H.; DE WEIJER, A.P.; VAN WIJK, R.J.; BUYDENS, L.M.C.; Strategy for constructing robust multivariate calibration models. *Chemometr Intell Lab*, 49, **1999**, 1.
- THOMAS, E.V.; A Primer on Multivariate Calibration. *Analytical Chemistry*, 66, **1994**, 795.
- TORAL, M. I.; LARA, N.; TAPIA, A. E.; TORRES, C.; RICHTER, P.; Spectral study and simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by digital derivative spectrophotometry. *Bol. Soc. Chilena Quim.*, 47, **2002**, 241.
- USP - The United States Pharmacopeia, 25ª edição, U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, **2002**, 1624-1627.
- VOGT, C.; Fármacos e Medicamentos: Urgências. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/farmacos/farma01.htm>, acessado em 12 de outubro de **2005**.
- WANG, A.; GONG, F.; LI, H.; FANG, Y.; Separation and determination of the active ingredients in tablets of composite sulphonamides by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *Anal. Chim. Acta*, 386, **1999**, 265.
- WEIGEL, S.; BESTER, K.; HÜHNERFUSS, H.; New method for rapid solid-phase extraction of large-volume water samples and its application to non-target screening of North Sea water for organic contaminants by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 912, **2001**, 151.

- ZAUGG, S.; ZHANG, X.; SWEEDLER, J.; THORMANN, W.; Determination of salicylate, gentisic acid and salicyluric acid in human urine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, 752, **2001**, 17.
- ZEEVI, M.; IVANOVI, L.J.; AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; MINIC, D.; The use of a response surface methodology on HPLC analysis of methyldopa, amiloride and hydrochlorothiazide in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24, **2001**, 1019.